

Universität Rostock
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Institut für Biowissenschaften



"24-*nor*-Ursodeoxycholsäure – eine neue antiinflammatorische und antifibrotische Behandlungsstrategie zur Verbesserung der entzündungsassoziierten Leberfibrose im Mausmodell der *Schistosoma mansoni* Infektion."

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von Martina Sombetzki
geb. am 25.10.1977 in Ueckermünde

Gutachter: **Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger** (Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten, Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Fakultät, Universität Rostock)

Prof. emer. Dr. rer. nat. Dieter G. Weiss (Institut für Biowissenschaften, Zellbiologie und Biosystemtechnik und Lichtmikroskopie-Zentrum, Universität Rostock)

Eingereicht am: 30. November 2012
Tag der öffentlichen Verteidigung: 8. Juli 2013

I	Inhaltsverzeichnis	
II	Abbildungen	
III	Tabellenverzeichnis	
IV	Abkürzungsverzeichnis	
1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	4
2.1	Die Schistosomiasis	5
2.1.1	Die Erreger und ihre Krankheitsbilder	6
2.1.1.1	Die urogenitale Schistosomiasis (Blasenbilharziose)	7
2.1.1.2	Die intestinale Schistosomiasis (Darmbilharziose)	8
2.1.2	<i>Schistosoma mansoni</i>	8
2.1.3	Therapie und Kontrolle der Schistosomiasis	10
2.1.4	Hepatische Granulome in der <i>Schistosoma mansoni</i> Infektion	12
2.2	Die Leberfibrose	13
2.2.1	Die Fibrogenese	14
2.2.2	Cholestase und Gallensäuretherapie	16
2.2.2.1	Ursodeoxycholsäure	17
2.2.2.2	24- <i>nor</i> -Ursodeoxycholsäure	18
2.2.2.3	Farnesoid X Rezeptor	19
2.2.3	Antifibrotische Therapien in der <i>Schistosoma mansoni</i> Infektion	20
3	Ziel- und Fragestellung	22
4	Material und Methoden	27
4.1	Mäuse und Parasiten	28
4.1.1	Genetischer Hintergrund der Versuchstiere	28
4.1.2	Haltung der Versuchstiere	28
4.1.3	Infektion der Schnecken und Mäuse	28
4.2	Infektions- und Futterprotokolle	29
4.2.1	Versuchsteil A: Der zeitliche Verlauf der chronischen <i>Schistosoma mansoni</i> Infektion	29
4.2.2	Versuchsteil B: Die Rolle des Farnesoid X Rezeptors in der granulomatösen Leberfibrose der <i>Schistosoma mansoni</i> Infektion	29
4.2.3	Versuchsteil C: Gallensäuretherapie	30
4.3	Euthanasie und Aufarbeitung der Versuchstiere	31
4.4	Analyse der Infektionsmarker	31

4.4.1	<i>Schistosoma mansoni</i> Antikörpernachweis	31
4.4.2	Mikroskopische Auszählung der Eigranulome	31
4.4.3	Serumbiochemie	32
4.5	mRNA Expressionsanalysen	32
4.5.1	RNA-Isolation	32
4.5.2	Reverse Transkription und SYBR Green-Analyse	32
4.6	Charakterisierung der Leberfibrose	34
4.6.1	Hydroxyprolin-Assay	34
4.6.2	Leberhistologie	35
4.6.3	Fibrose-Score	35
4.6.4	Morphometrische Analyse der Granulomgröße	35
4.7	Antikörpernachweise	35
4.7.1	Immunhistochemie	35
4.7.2	Westernblot	36
4.7.3	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	38
4.8	Generierung von Makrophagen und Dendritischen Zellen aus dem Knochenmark	39
4.8.1	Isolation von Knochenmarkszellen	39
4.8.2	Durchflusszytometrie	40
4.8.2.1	Probenvorbereitung und Fluoreszenzmarkierung	41
4.8.2.2	Datenanalysen	41
4.9	Isolation von T-Helferzellen aus murinen, mesenterialen Lymphknoten	42
4.9.1	<i>Magnetic activated cell sorting</i> (MACS)	42
4.9.1.1	Positive Selektion von CD4 ⁺ T-Zellen	42
4.9.1.2	T-Zell-Aktivierung	43
4.9.1.3	Proliferationsmessung	43
4.10	Präparation adulter <i>Schistosoma mansoni</i> Würmer	44
4.11	Statistische Analysen	44
5	Ergebnisse	46
5.1	Versuchsteil A: Der zeitliche Verlauf der <i>Schistosoma mansoni</i> Infektion	47
5.1.1	Analyse der Infektionsmarker	47
5.1.2	Charakterisierung der Leberfibrose	47
5.1.3	Umbau der Gallengänge	50

5.2	Versuchsteil B: Die Rolle des Farnesoid X Rezeptors in der granulomatösen Leberfibrose der <i>Schistosoma mansoni</i> Infektion	53
5.2.1	Analyse der Infektionsmarker	53
5.2.2	Charakterisierung der Leberfibrose	54
5.3	Versuchsteil C: Gallensäuretherapie	55
5.3.1	Analyse der Infektionsmarker	55
5.3.2	Weder UDCA noch <i>nor</i> UDCA zeigen <i>in vitro</i> antihelminthische Effekte	56
5.3.3	<i>Nor</i> UDCA hemmt die Entzündungsreaktion und die Granulomformation	57
5.3.4	<i>Nor</i> UDCA reduziert die hepatische Fibrose	59
5.3.5	<i>Nor</i> UDCA beeinflusst die Oberflächenexpression des Haupthisto-kompatibilitätskomplexes (Klasse II, MHC II) auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und die Proliferation aktivierter CD4 ⁺ T-Lymphozyten	61
5.3.5.1	<i>Nor</i> UDCA hemmt die MHC II Expression auf Makrophagen und Dendritischen Zellen	61
5.3.5.2	<i>Nor</i> UDCA hemmt die Proliferation von aktivierten CD4 ⁺ T-Lymphozyten	63
6	Diskussion	65
6.1	Versuchsteil A: Der zeitliche Verlauf der <i>Schistosoma mansoni</i> Infektion	66
6.1.1	Die Gallengangsschädigung – sekundärer Nebeneffekt oder aktiver Player?	66
6.1.2	MMPs und TIMPs: Marker zur quantitativen Bewertung der Fibrose	69
6.2	Versuchsteil B: Die Rolle des Farnesoid X Rezeptors in der granulomatösen Leberfibrose der <i>Schistosoma mansoni</i> Infektion	70
6.2.1	Leberzellschäden: FXR knock-out oder Infektion?	70
6.2.2	FXR – ein Modulator der nicht biliären Leberfibrose?	71
6.3	Versuchsteil C: Gallensäuretherapie	72
6.3.1	<i>Nor</i> UDCA und die granulomatöse Entzündung	73
6.3.2	<i>Nor</i> UDCA und die Th2-Reaktion	74
6.3.3	<i>Nor</i> UDCA und die Antigenpräsentation	75
6.3.4	<i>Nor</i> UDCA und die antihelminthische Wirkung	77
6.3.5	<i>Nor</i> UDCA und die Notwendigkeit einer wirksamen antifibrotischen Therapie der <i>Schistosoma mansoni</i> induzierten Leberfibrose	77

7	Literaturverzeichnis	79
8	Anhang	92
V	Beruflicher Werdegang	
VI	Veröffentlichungen	

Abbildung 1:	Schematische Darstellung eines Schistosomen-Pärchens
Abbildung 2A:	Verbreitungsgebiete von <i>S. haematobium</i> , <i>S. japonicum</i> und <i>S. mekongi</i>
Abbildung 2B:	Verbreitungsgebiete von <i>S. mansoni</i> und <i>S. intercalatum</i>
Abbildung 3:	Ei von <i>S. haematobium</i> mit terminalem Stachel
Abbildung 4:	Reifestadien von <i>Schistosoma mansoni</i>
Abbildung 5:	<i>Schistosoma mansoni</i> Lebenszyklus
Abbildung 6:	Paraffinisierte Leberschnitte <i>Schistosoma mansoni</i> infizierter Mäuse (H&E-Färbung)
Abbildung 7:	Paraffinisierte Leberschnitte <i>Schistosoma mansoni</i> infizierter Mäuse (SR-Färbung)
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der Leberfibrosierung
Abbildung 9:	Strukturformeln von <i>nor</i> UDCA und UDCA
Abbildung 10:	Versuchsaufbau A – Der zeitliche Verlauf der chronischen <i>S. mansoni</i> Infektion
Abbildung 11:	Versuchsaufbau B – Die Rolle des Farnesoid X Rezeptors in der <i>S. mansoni</i> Infektion
Abbildung 12:	Versuchsaufbau C – Gallensäuretherapie
Abbildung 13:	Sandwichaufbau im Westernblot
Abbildung 14:	Funktionsprinzip des Durchflusszytometers
Abbildung 15:	Zeitabhängige Entwicklung der hepatischen Fibrose in der <i>S. mansoni</i> Infektion
Abbildung 16:	Dysbalance der Matrixmetalloproteinase und ihrer Inhibition in der frühen und späten Phase der chronischen <i>S. mansoni</i> Infektion
Abbildung 17:	Die Dynamik der mRNA Expression von iNOS (graue Balken) und TGF- β 1 (schwarze Balken) während der <i>S. mansoni</i> Infektion
Abbildung 18:	A-SMA-Expression in der frühen und späten Phase der chronischen <i>S. mansoni</i> Infektion (Westernblot)
Abbildung 19:	A-SMA Expression in der voranschreitenden <i>S. mansoni</i> Infektion (Histologie)
Abbildung 20:	Korrelation zwischen hepatischer Fibrose und duktilärer Proliferation in Lebern <i>S. mansoni</i> infizierter Mäuse

- Abbildung 21:** Westernblot-Analyse der Keratin 19 (K19) Expression im Verlauf der chronischen *S. mansoni* Infektion
- Abbildung 22:** VCAM-1 und K19 Expression in *S. mansoni* Ei-Granulomen
- Abbildung 23:** Westernblot-Analyse zur VCAM-1 Expression in Lebern *S. mansoni* infizierter Mäuse 8 und 24 Wo *pi*
- Abbildung 24:** Die Depletion von FXR hat keinen Einfluss auf den Grad der Fibrose in *S. mansoni* infizierten Mäusen
- Abbildung 25:** NorUDCA reduziert die Granulomgröße infizierter *S. mansoni* Mäuse im chronischen Krankheitsstadium
- Abbildung 26:** Adulte *S. mansoni* Würmer mit Eiern in Kultur
- Abbildung 27:** NorUDCA hemmt die Einwanderung von Entzündungszellen
- Abbildung 28:** NorUDCA reduziert die Bildung fibrotischer Septen
- Abbildung 29:** Die Quantifizierung der Leberfibrose in *S. mansoni* infizierten Mäusen
- Abbildung 30:** Interleukin-13 Expression in Serumproben *S. mansoni* infizierter Mäuse mit und ohne Gallensäuretherapie
- Abbildung 31:** Kultur von Makrophagen (BMDM) und Dendritischen Zellen (BMDC)
- Abbildung 32:** NorUDCA reduziert die Expression von MHC II – Molekülen auf der Oberfläche von Makrophagen und Dendritischen Zellen
- Abbildung 33:** NorUDCA verhindert die Aktivierung und Proliferation von CD4⁺ T-Lymphozyten

- Tabelle 1:** Die fünf humanpathogenen *Schistosoma*-Arten und deren Krankheitsbilder
- Tabelle 2:** Real-time PCR Primer-Sequenzen (5'-3')
- Tabelle 3:** Verdünnungsschritte des Hydroxyprolinstandards
- Tabelle 4:** Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie
- Tabelle 5:** Antikörper für die Durchflusszytometrie
- Tabelle 6:** Leber Serumbiochemie im zeitlichen Verlauf der *S. mansoni* Infektion
- Tabelle 7:** Leber Serumbiochemie: FXR+/+ versus FXR-/- während der *S. mansoni* Infektion
- Tabelle 8:** Leber Serumbiochemie unter unterschiedlichen experimentellen Ansätzen
- Tabelle 9:** Die mRNA Expressionsprofile unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen (SYBR Green Analyse)

ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
36b4	<i>acidic ribosomal phosphoprotein P0</i>
bd	Gallengang (<i>bile duct</i>)
BDL	<i>bile duct ligation</i>
<i>B. glabrata</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>
BMDCs	<i>bone marrow derived dendritic cells</i>
BMDMs	<i>bone marrow derived macrophages</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSEP	<i>bile salt export pump</i>
DDC	3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidin
CDCA	Chenodeoxycholsäure
DALY	<i>disability adjusted life years</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
e	Ei
6-ECDCA	<i>6-ethyl chenodeoxycholic acid</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FXR	Farnesoid X Rezeptor
g	Granulom
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i>
Gapdh	Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HP	Hydroxyprolin (L-4-Hydroxyprolin)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSC	hepatische Stellatzelle
IL-1β	Interleukin 1-beta
IL-13	Interleukin 13
INF-γ	Interferon-gamma
iNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
<i>Lnn jejun</i>	<i>Lymphnode jejun</i>

<i>Lnn iliaci</i>	<i>Lymphnode iliaci</i>
<i>Lnn colici</i>	<i>Lymphnode colici</i>
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
Mdr2 (Abcb4) knock-out	<i>multidrug resistance-2 knock-out</i>
mLNN	mesenterialer Lymphknoten
MMP	Matrixmetalloproteinase
<i>norUDCA</i>	<i>24-nor-Ursodeoxycholsäure</i>
NF-κB	<i>nuclear factor κ-beta</i>
Ntcp	<i>Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide</i>
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
pi	<i>post infectionem</i> (nach der Infektion)
PPAR-γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
Procol 1a2	Procollagen 1a2
PVFD-Membran	Poly-Vinyliden-Fluorid-Membran
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-time reverse Polymerase-Kettenreaktion
SEA	lösliche Eiantigene (<i>soluble egg antigens</i>)
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
Shp	<i>small heterodimer partner</i>
TGF-β1	<i>transforming-growth factor-β1</i>
Th1	T-Helferzellen vom Subtyp 1
Th2	T-Helferzellen vom Subtyp 2
TIMP	<i>tissue inhibitors of matrixmetalloproteinases</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
UDCA	Ursodeoxycholsäure
VBDS	<i>vanishing bile-duct syndrome</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein-1</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>

1 Zusammenfassung

Die immunologischen Vorgänge während der Infektion mit *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) sind sehr komplex. Die entzündlichen und profibrotischen „Schlüsselmomente“ verlaufen weitgehend voneinander getrennt und sind trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet noch nicht vollständig aufgeklärt. Während der Infektion mit *S. mansoni* kommt es durch die im Lebergewebe festsitzenden Eier zu einer massiven, granulomatösen Entzündung mit nachfolgender Fibrosierung der Leber. Portaler Hochdruck, Aszites und Ösophagus-Varizenblutungen sind die Folge. Eine antihelminthische Therapie mit dem Goldstandard Praziquantel führt zur Beseitigung der adulten Würmer, wirkt aber nicht gegen die in den feinen Lebersinusoiden festsitzenden Eier und die daraus resultierenden, oben geschilderten Komplikationen, welche das späte Krankheitsbild der Schistosomiasis darstellen. Daher besteht die dringende Notwendigkeit, eine wirkungsvolle, antifibrotische Therapie der *S. mansoni* Infektion zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Krankheitsbild der granulomatösen Leberfibrose während der *S. mansoni* Infektion aus einer neuen Perspektive, basierend auf der Gallengangsschädigung und dem Gallensäuretransport verbunden mit einer neuen Gallensäure-Therapie, betrachtet.

Ziel dieser Arbeit war es,

(A) die Beeinflussung von Gallengangsepithelzellen durch die granulomatöse Entzündung in der Leber mit *S. mansoni* infizierten Mäusen zu charakterisieren und darüber hinaus zu untersuchen, inwieweit geschädigtes Gallengangsepithel zur Fibrosierung der Leber beiträgt.

(B) Darüber hinaus sollte untersucht werden, welche Rolle der Gallensäurerezeptor Farnesoid X Rezeptor (FXR), als neuer potentieller Fibrosemulator (Fiorucci *et al.* 2005), in der Fibrogenese der *S. mansoni* Infektion spielt.

(C) Des Weiteren sollte geprüft werden, ob die neue, künstliche Gallensäure 24-*nor*-Ursodeoxycholsäure (*nor*UDCA), welche bereits in einem Mausmodell mit biliärer Fibrose (Mdr2/Abcb4 knock-out) hohe antiinflammatorische und antifibrotische Wirkung zeigte (Fickert *et al.* 2006), auch im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion zur einer Verbesserung der granulomatösen Fibrose beiträgt.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass

- im zeitlichen Verlauf der chronischen *S. mansoni* Infektion die direkte Beteiligung geschädigter Gallengänge als treibende Kraft für die Fibrosierung der Leber ausgeschlossen werden kann. Die starke Beeinflussung der Gallengänge (duktuläre Proliferation, Verdrängung) wurde ca. 24 Wochen nach Infektion deutlich und erscheint als Folge der platznehmenden Zunahme der Granulomzahl und -größe in der Leber.
- eine hepatische Fibrose, ohne primär biliären Hintergrund, wie sie die *S. mansoni* Infektion darstellt, nicht durch das Ausschalten des FXR beeinflusst wird.
- eine 4-wöchige Behandlung mit *nor*UDCA eine starke antiinflammatorische und antifibrotische Wirkung im Vergleich zur herkömmlichen Gallensäure Ursodeoxycholsäure (UDCA) hatte. Die Behandlung mit *nor*UDCA führte zur Reduktion der Granulomgröße und der hepatischen Fibrose. In Bezug auf die Entzündungsreaktion ruft auch die Behandlung mit UDCA eine Reduktion der Expression proinflammatorischer Zytokine der T-Helferzellen vom Subtyp 1 (Th1), wie TNF- α , INF- γ und IL-1 β hervor. Diese Reduktion hat aber keine Auswirkung auf die Th2-gesteuerte Granulomformation oder die Leberfibrose. Die antifibrotische Wirkung von *nor*UDCA richtet sich gegen die Th2 gesteuerte Immunantwort.

2.1 Die Schistosomiasis

Die Schistosomiasis (auch Bilharziose) ist eine chronische parasitäre Erkrankung, hervorgerufen durch digenetische Saugwürmer (Trematoden) der Gattung *Schistosoma spp.* (Pärchenegel). Die Bezeichnung "Schistosomiasis" (griech. *schistós* = getrennt; *soma* = Körper) bezieht sich auf die Gestalt der in Dauerkopulation lebenden adulten Würmer (Abb. 1).

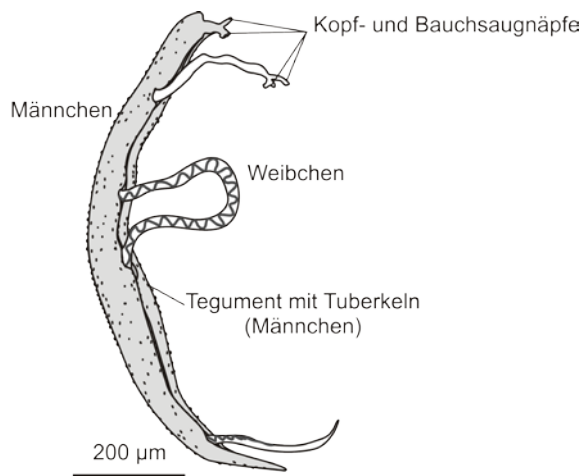


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Schistosomen-Pärchens

Die Bauchfalten des männlichen Wurms bilden einen gynäkophorischen Kanal, in welchem das Weibchen lebt. (Quelle: Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsklinik Rostock)

Die Schistosomiasis gilt weltweit als zweithäufigste parasitäre Tropenerkrankung nach der Malaria. Nach Angaben der *World Health Organisation* (WHO) benötigen derzeit über 230 Millionen Menschen medizinische Versorgung infolge der Infektion (WHO 2010). Über 600 Millionen Menschen leben in Risikogebieten (Chitsulo *et al.* 2004), welche sich auf 77 Länder, ausschließlich in den Tropen und Subtropen, verteilen (Abb. 2A und 2B). Der größte Anteil (90%) der infizierten Menschen lebt in Subsahara-Afrika. Trotz der im Vergleich zur Malaria geringen Sterblichkeit (Schistosomiasis: 44.000 Tote/Jahr; Malaria: 1,2 Mio.Tote/Jahr) (Murray *et al.* 2012) führt die Infektion zu einem lebenslangen Leidensweg. Es entsteht ein Kreislauf, der wegen Arbeitsunfähigkeit zu Armut und unzureichender medizinischer Versorgung führt. Eine statistische Analyse über den *Disability-adjusted life years* (DALY)-Faktor wurde entwickelt, um die Gesundheitslast spezifischer Erkrankungen quantifizieren und vergleichbar machen zu können. Das Konzept des DALY verbindet die Summe verlorener Lebensjahre durch den verfrühten Tod mit der Summe der Lebensjahre mit starker gesundheitlicher Einschränkung, hervorgerufen durch die Erkrankung. Bezogen auf die Schistosomiasis sind das 1,76 Millionen DALYs (Mathers *et al.* 2007). Die Schistosomiasis steht damit an der Spitze der „*Tropical Neglected*

Diseases“ und stellt ein globales, anhaltendes Gesundheitsproblem von hoher sozioökonomischer Relevanz dar (Utzinger *et al.* 2009).

2.1.1 Die Erreger und ihre Krankheitsbilder

Es gibt fünf humanpathogene *Schistosoma* Arten (Secor *et al.* 2005), welche zwei unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen: die intestinale Schistosomiasis (auch Darmbilharziose) und die urogenitale Schistosomiasis (auch Blasenbilharziose). In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 1) sind die Erreger der Häufigkeit ihres Auftretens nach aufgelistet.

Tabelle 1: Die fünf humanpathogenen *Schistosoma*-Arten und ihre Krankheitsbilder

<i>Schistosoma</i> spp.	Verbreitung/Region	Krankheitsbild	Zwischenwirt
<i>S. mansoni</i>	Afrika, Teile Asiens, Südamerika	Darmbilharziose	<i>Biomphalaria</i> spp.
<i>S. haematobium</i>	Afrika, Südwestasien	Urogenitalbilharziose	<i>Bulinus</i> spp.
<i>S. intercalatum</i>	Afrika	Darmbilharziose	<i>Bulinus forskalii</i> , <i>Indoplanorbis</i> spp.
<i>S. japonicum</i>	Ostasien	Darmbilharziose	<i>Oncomelania hupensis</i>
<i>S. mekongi</i>	Südostasien	Darmbilharziose	<i>Neotricula aperta</i>

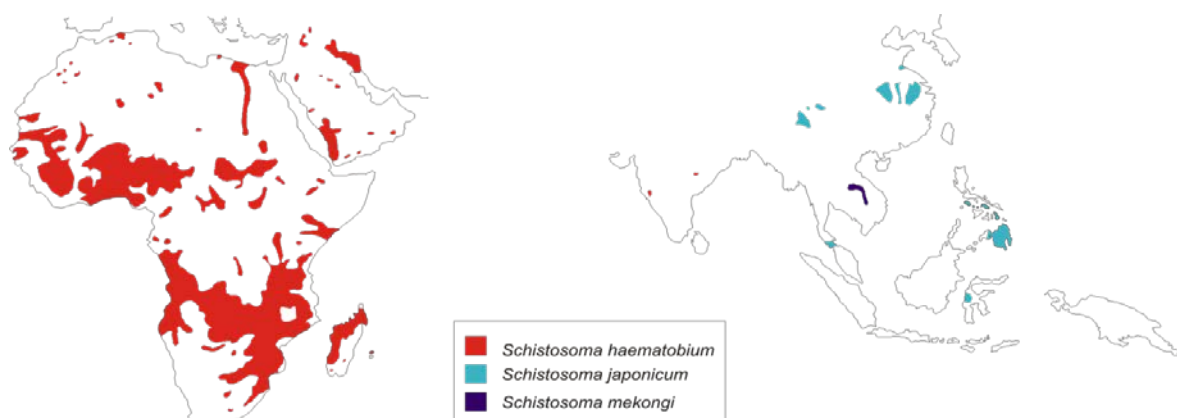


Abbildung 2A: Verbreitungsgebiete von *S. haematobium*, *S. japonicum* und *S. mekongi*.

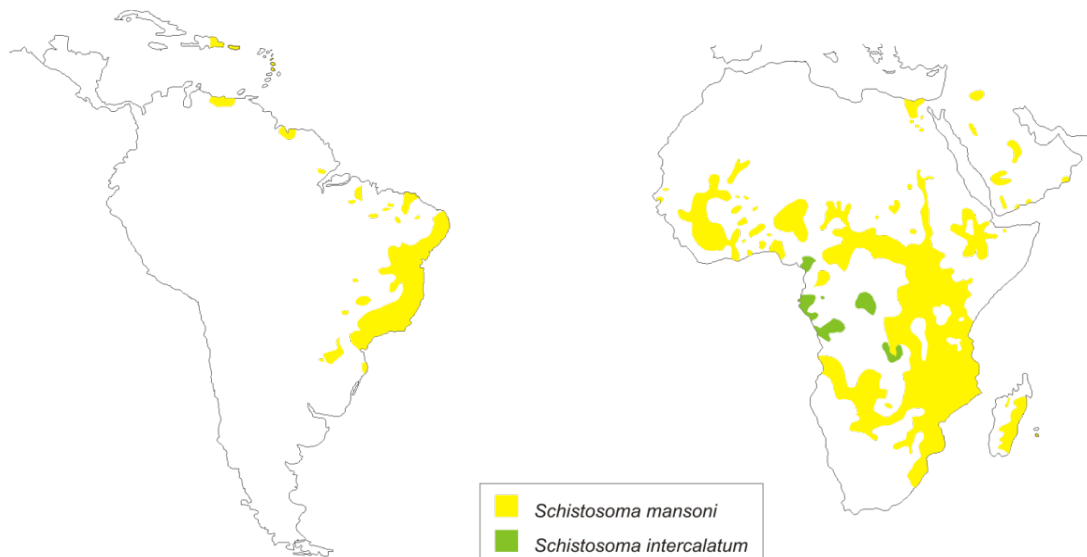


Abbildung 2B: Verbreitungsgebiete von *S. mansoni* und *S. intercalatum* (Quelle 2A und 2B: Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsklinik Rostock)

2.1.1.1 Die urogenitale Schistosomiasis (Blasenbilharziose)

Das Krankheitsbild der Schistosomiasis war bereits zur Pharaonenzeit (ägyptische Hämaturie) bekannt. Aber erst im Jahre 1851 wurden in Kairo durch den deutschen Arzt Theodor M. Bilharz zum ersten Mal in menschlichen Leichen adulte Würmer und deren Eier mit terminalem Stachel im Blasengewebe und die adulten Würmer im Venengeflecht der Blase beschrieben. Ihrem Entdecker nach wurden die „kopulierenden Saugwürmer“ zunächst *Bilharzia haematobia* genannt (Anonymus. Bilharz, Theodor Maximilian, 1998). Die Erkrankung erhielt demnach die Bezeichnung „Bilharziose“, welche nach dem 2. Weltkrieg durch die internationale Bezeichnung „Schistosomiasis“ abgelöst wurde. Auch die Gattungsbezeichnung wurde durch *Schistosoma* (in diesem Fall nun *Schistosoma haematobium*) ersetzt.

Adulte *S. haematobium* leben im Venengeflecht der Blase. Die hier abgelegten Eier (Abb. 3) wandern in Blase und Genitalien des Wirtes ein. Hier verursachen sie eine entzündungsassoziierte Granulombildung mit weitreichenden Folgen für die befallenen Organe: Hämaturie, Dysurie und Verkalkung der Blasenwand. Des Weiteren führt eine Infektion mit *S. haematobium* nicht selten zu Blasenkrebs (Parkin 2006). Auch wird durch die starke Schädigung des Genitaltraktes sowohl bei Männern als auch bei Frauen das Infektionsrisiko für HIV stark erhöht (Kjetland *et al.* 2006).



Abbildung 3: Ei von *S. haematobium* mit terminalem Stachel. (Quelle: Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsklinik Rostock)

2.1.1.2 Die intestinale Schistosomiasis (Darmbilharziose)

1907 entdeckte Luigi Sambon eine ähnliche Art von Saugwürmern, welche Eier mit lateralem Stachel produzieren (Abb. 4). Er nannte diese Art *Schistosoma mansoni*.

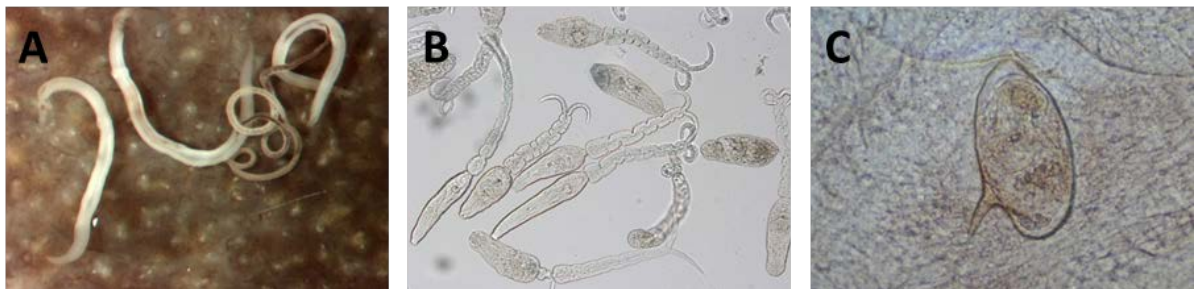


Abbildung 4: Reifestadien von *Schistosoma mansoni*: (A) Adulte Pärchen; (B) Gabelschwanzzerkarien; (C) Ei mit lateralem Stachel; (A: 50fache Vergrößerung, B: 200fache Vergrößerung, C: 400fache Vergrößerung). (Quelle: Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsklinik Rostock)

Obwohl die Darmbilharziose durch drei weitere *Schistosoma*-Arten (*S. japonicum*, *S. intercalatum* und *S. mekongi*) ausgelöst werden kann, beziehen sich die folgenden Beschreibungen des Krankheitsbildes und die Untersuchungen in dieser Arbeit ausschließlich auf den Erreger *Schistosoma mansoni*.

2.1.2 *Schistosoma mansoni*

Alle *Schistosoma*-Arten pflanzen sich in einem komplexen Invertebraten/Vertebraten Lebenszyklus fort (Abb. 5). Dabei hat jede Art eine spezifische Süßwasserschnecke als Zwischenwirt. Im Fall von *S. mansoni* ist dies *Biomphalaria* spp. (in Afrika überwiegend *Biomphalaria glabrata*). In der Schnecke findet die asexuelle Fortpflanzung des Parasiten statt. Die sexuelle Fortpflanzung und Eiablage vollzieht sich im Endwirt (Mensch und andere Säugetiere) (Fenwick 1969). Eine Besonderheit von Schistosomen ist ihre Getrenntgeschlechtlichkeit (Pearce & MacDonald 2002). Das dünnere, längere und bräunlich erscheinende Weibchen (bräunliche Färbung durch Hämozoinpigment im Darm) persistiert in einer Dauercopula im gynäkophorischen Kanal des Männchens (Abb. 1 und 4). Nach Erreichen der sexuellen Reife in den Mesenterialvenen produziert ein *S. mansoni* Weibchen bis zu

300 Eier/Tag. Diese können sich mit ihrem lateralen Stachel an der Gefäßwand festsetzen. Durch die Sekretion proteolytischer Enzyme rufen sie eine lokale T-Zell-vermittelte Entzündung hervor. Diese Entzündungsreaktion ermöglicht den Eiern den Durchtritt durch die Blutgefäß- und anschließend durch die Darmwand. So werden sie mit dem Stuhl ausgeschieden und erneut in den Lebenszyklus eingeführt.

Etwa ein Drittel der Eier wird allerdings mit dem Blutstrom über die Portalvene in die Leber gespült. Hier bleiben die Eier in den feinen Lebersinusoiden stecken. Dieser Weg stellt aus reproduktiver Sicht eine Sackgasse dar, ist aber die Ursache für die Entstehung des Krankheitsbildes der Schistosomiasis. Während die Würmer durch einen „surface coat“ des Integuments mit Wirtsantigenen (HLA-Moleküle, Immunglobuline, Lipoproteine, etc.) eine Membranocalyx ausbilden (Skelly *et al.* 2006) und sich so vor der Immunabwehr des Wirtes schützen können, rufen die Eier eine starke Entzündungsreaktion hervor. Diese führt zur Granulombildung und zur Fibrosierung der Leber mit zum Teil schwerwiegenden klinischen Folgen für den Wirtsorganismus: portaler Hochdruck, Aszites, Hepatosplenomegalie und Ösophagusvarizenblutungen, die zum Tod führen können (Stadecker *et al.* 2001).

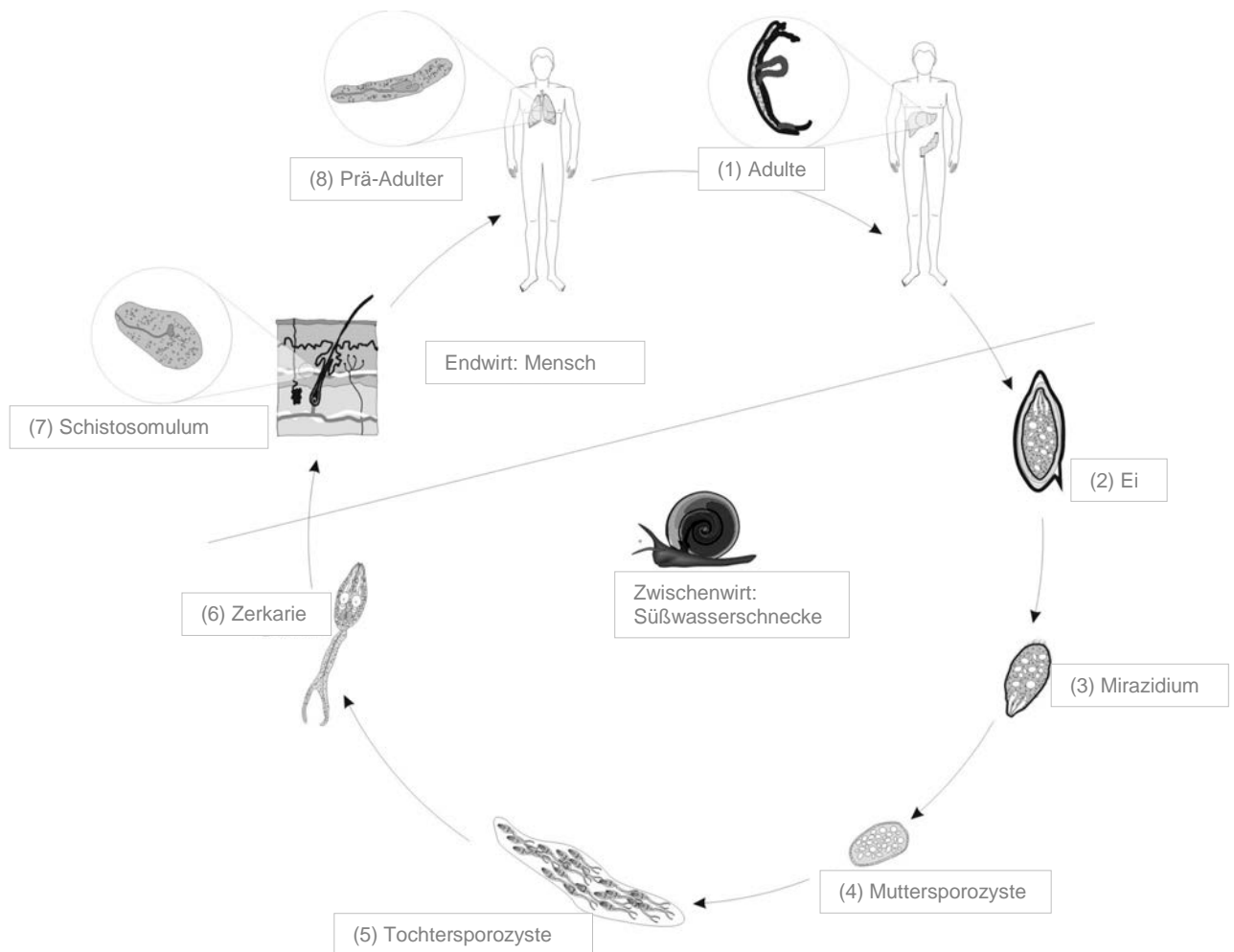


Abbildung 5: *Schistosoma mansoni* Lebenszyklus

Gezeigt sind die verschiedenen Schritte der Parasitenentwicklung vom Schistosomulum bis zur infektiösen Larve unter Berücksichtigung des Wirtswechsels. ① Die verpaarten, geschlechtsreifen adulten Egel persistieren in den Mesenterialvenen und produzieren bis zu 300 Eier täglich. ② Die Parasiten-Eier durchwandern mit Hilfe einer lokal hervorgerufenen Entzündungsreaktion Gefäß- und Darmwand und werden mit dem Stuhl ausgeschieden. ③ Durch Frischwasserkontakt schlüpft das im Ei enthaltene Mirazidium (1. Larvenstadium), welches aktiv (Cilien) den Zwischenwirt (Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata*) sucht. Nach Penetration der Schnecke entwickelt sich aus dem Mirazidium die ④ Muttersporozyste. Durch ungeschlechtliche Vermehrung entstehen aus den Keimzellen der Muttersporozyste die ⑤ Tochterporozysten aus denen entweder weitere Tochterporozysten oder ⑥ infektiöse Zerkarien (Gabelschwanzlarven) entstehen. Diese können nach Abwurf ihres Gabelschwanzes die Haut des Endwirts durchdringen und sich zum ⑦ Schistosomulum transformieren. Nach der Lungenpassage wandern die ⑧ Präadulten ins Pfortadersystem, wo sie als geschlechtsreife ⑨ adulte Pärchen erneut mit der Eiablage beginnen (Quelle: Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsklinik Rostock).

2.1.3 Therapie und Kontrolle der Schistosomiasis

Aufgrund eines bislang fehlenden, wirksamen Impfstoffes (Bergquist & Colley 1998; Gryseels 2000), bzw. einer fehlenden Chemoprophylaxe gegen die Infektion stellt die antihelminthische Chemotherapie derzeit die einzige wirkungsvolle Möglichkeit dar, die Morbidität und die Ausbreitung der Infektion zu kontrollieren (WHO 2002). Weitere Bekämpfungsmaßnahmen zielen darauf ab, die Ausbreitung der Schnecken

zu verhindern, sanitäre Anlagen zu verbessern und gesundheitliche Aufklärung in Endemiegebieten zu betreiben.

Das Antihelminthikum Praziquantel (z.B. Biltricide® oder Cesol®), ein Pyrazinoisoquinoline-Derivat, stellt das Mittel der Wahl gegen alle humanpathogenen Schistosomen-Arten dar. Aufgrund seiner guten Verträglichkeit und seiner hohen schistosomiziden Wirkung (Pellegrino *et al.* 1977) wird es in großen und internationalen Initiativen zur Massenbehandlung der Schistosomiasis mit Therapieerfolgen zwischen 70 und 100% (Löscher *et al.* 2000; Cioli *et al.* 2003) eingesetzt. Der Wirkungsmechanismus dieses Medikamentes ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt (Cioli *et al.* 1995). Bekannt ist zum einen, dass die Praziquantel-Therapie zur Zerstörung des Wurmtegumentes führt und zur Zerstörung der immunologischen Maskierung und somit zur Aktivierung der natürlichen Immunabwehr (Modha *et al.* 1990; Ribeiro *et al.* 1998). Darüber hinaus führt Praziquantel zu einem massiven Kalziumeinstrom über ladungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle im Tegument (Cioli *et al.* 1998; Redman *et al.* 1996), was spastische Lähmungen der Würmer zur Folge hat (Jeziorski & Greenberg 2006). Ein großer Nachteil der Praziquantel-Therapie ist die Wirkungslosigkeit gegenüber den Entwicklungsstadien (Schistosomulae, Präadulte und juvenile Stadien). Das bedeutet, dass eine Therapie mit Praziquantel keinen Schutz vor Neuinfektion bietet.

Darüber hinaus zeigen sich mittlerweile in weiten Bereichen der Behandlungsgebiete Resistenzen gegen den Wirkstoff (Ismail *et al.* 1994; Fallon *et al.* 1995; Picquet *et al.* 1998; Gryseels *et al.* 2001). In Ägypten und im Senegal sind bereits über 60% aller *S. mansoni* infizierten Patienten resistent gegenüber Praziquantel (Doenhoff *et al.* 2002). Hier greifen Medikamente wie Oxamniquine (Mansil®, Tetrahydroquinolin-Derivat) (Richards & Forster 1969) mit sehr hoher schistosomizider Wirkung oder Metrifonat (Anticholinesterase) mit einer Praziquantel-ähnlichen Wirksamkeit gegenüber *S. haematobium* (Camacho & Agnew 1995). Metrifonat ist allerdings wenig wirksam gegenüber *S. mansoni* und *S. japonicum*. Darüber hinaus hat es Nebenwirkungen, wie Durchfall, Brechreiz und Bauchkrämpfe.

Ansätze zur Entwicklung adäquater Impfstoffe gegen *Schistosoma spp.* werden seit vielen Jahren von großen Arbeitsgruppen unternommen. Ein vielversprechendes Ziel

ist hier 28kDa Glutathion-S-Transferase (28GST), deren Inhibition zur reduzierten Fruchtbarkeit der Weibchen führt (Capron *et al.* 2002).

2.1.4 Hepatische Granulome in der *Schistosoma mansoni* Infektion

Granulome sind Ansammlungen von transformierten Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten und mehrkernigen Riesenzellen (Wainwright 2007). Ein *S. mansoni* Ei enthält kurz nach Einschwemmen in die Leber noch ein lebendes Mirazidium (Abb. 6A). Durch die Sekretion proteolytischer Enzyme werden Entzündungszellen angelockt, welche das Ei umschließen. Ein älteres Granulom besteht nur noch aus der leeren Eihülle und einer fibrotischen Narbe (Abb. 6B). Bei der Granulomformation handelt es sich um eine zellvermittelte Hypersensitivitätsreaktion des Typs IV (Spätreaktion) (Flores-Villanueva *et al.* 1996). Hierbei vermitteln $CD4^+$ T-Helferzellen nach Antigenkontakt durch die Freisetzung von Zytokinen (Typ IVa: Interferon-gamma, $INF-\gamma$; Tumornekrosefaktor-alpha, $TNF-\alpha$; Typ IVb: Interleukin-5) eine Endothelaktivierung bzw. Aktivierung von Eosinophilen. Bis zur Rekrutierung weiterer Entzündungszellen können bei diesem Typ der Hypersensibilitätsreaktion bis zu 48 h vergehen.

Die frühen Wurmstadien rufen eine transiente, schwache Th1-Reaktion hervor, da sie durch einen „surface-coat“ (Maskierung mit Wirtsantigenen: HLA-Moleküle, Immunglobuline, Lipoproteine) vor der immunologischen Abwehr des Wirtes weitgehend geschützt sind. Diese Reaktion ist charakterisiert durch die Expression von $INF-\gamma$, $TNF-\alpha$ und der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) (Pearce & MacDonald 2002).

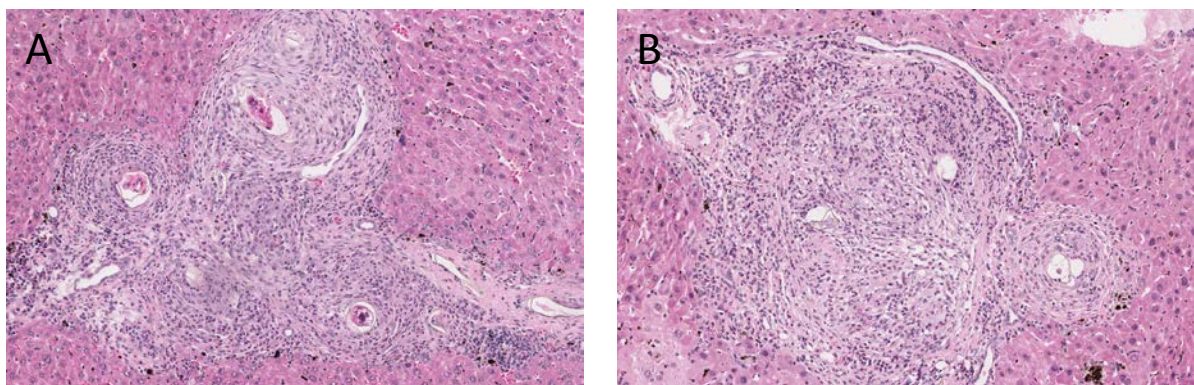


Abbildung 6: Paraffinisierte Leberschnitte *Schistosoma mansoni* infizierter Mäuse (H&E – Färbung): (A) Lebende *S. mansoni* Eier mit Mirazidium. (B) Abgestorbene *S. mansoni* Eier. (400fache Vergrößerung)

Vier bis fünf Wochen nach der Infektion sind die Würmer geschlechtsreif und beginnen mit der Eiablage. Anders als die „maskierten“ Würmer, initiiert die Eiablage eine starke Immunreaktion des Wirtes. Diese ist charakterisiert durch alternativ aktivierte Makrophagen, welche T-Helferzellen vom Subtyp 2 (Th2) aktivieren. Diese unterdrücken durch die Sekretion profibrotischer Zytokine (IL-5, IL-4, IL-13) die Entzündung und die Produktion proinflammatorischer Th1-Zytokine (z.B. TNF- α und INF- γ) und fördern durch ihren profibrotischen Einfluss die Ausheilung der Entzündungsherde (Stadecker *et al.* 2004) (Abb. 7A und B). Im weiteren chronischen Verlauf der Erkrankung wird dies deutlich durch eine verringerte Granulomgröße (Boros *et al.* 1975). Der Übergang von der entzündlichen Th1 dominierten Reaktion auf die Würmer im Blut wird damit abgelöst durch die profibrotische Th2-Reaktion auf die Eiablage. Der Übergang von Th1 zu Th2 ist fließend. Die ersten Granulome in der Leber stehen noch unter einem stärkeren entzündlichen Th1-Einfluss mit deutlich größeren Granulomen, während der Granulomumfang im chronischen Stadium der Infektion deutlich abnimmt. Da allerdings eine selbstlaufende Fibrosierung ebenso organschädigend ist, wie eine überschießende Entzündungsreaktion auf den Parasiten, ist eine Balance zwischen Entzündung (Th1) und Fibrose/Wundheilung (Th2) essentiell für das Überleben von Wirt und Parasit (Wynn *et al.* 2004).

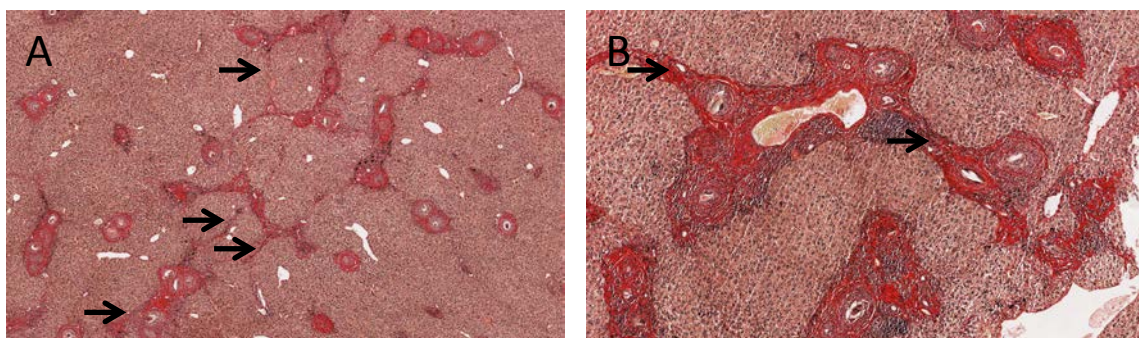


Abbildung 7: Paraffinisierte Leberschnitte *Schistosoma mansoni* infizierter Mäuse (Sirius Red – Färbung)

(A) Übersichtsdarstellung (100fache Vergrößerung), dunkelrote Granulome mit portoportalener fibrotischer Brückenbildung (Pfeile); **(B)** *S. mansoni* Eier mit Granulomen und entzündlichem Infiltrat. (400fache Vergrößerung)

2.2 Die Leberfibrose

Der fibrotische Umbau der Leber ist der gemeinsame Endweg einer Vielzahl von Lebererkrankungen. Zur Untersuchung der Leberfibrose und zur Entwicklung neuer antifibrotischer Therapien finden unterschiedliche Mausmodelle Anwendung (Hemmann *et al.* 2007). Die *S. mansoni* Infektion in der Maus induziert eine starke

entzündungsassoziierte Leberfibrose und spiegelt in hohem Maße die pathologischen Vorgänge im Menschen wider (Brunet *et al.* 1998).

Die Ursachen für die Entstehung einer Leberfibrose sind vielfältig. Hier stehen an erster Stelle die chronischen Virusinfektionen (z.B. Hepatitis B und C) (Poovorawan *et al.* 2002). Zu den Infektionskrankheiten zählen aber auch parasitäre Infektionen, z.B. die *S. mansoni* Infektion. In die autoimmunen Lebererkrankungen reihen sich die Primär biliäre Zirrhose, Primär sklerosierende Cholangitis (PSC) und die Autoimmune Hepatitis ein. Darüber hinaus können erbliche Erkrankungen (Morbus Wilson, Zystische Fibrose), toxische Schädigungen (Alkoholabusus und Medikamente) oder andere Einflüsse (Gallensteine) zur Entstehung einer Leberfibrose führen. Obwohl die Leber ein großes Regenerationsvermögen besitzt und die Fähigkeit zu einer *restitutio ad integrum* (Neubauer *et al.* 2001), kann eine schädigende Noxe, wenn sie nicht beseitigt wird, zu einer chronischen Schädigung mit folgender Leberfibrose führen.

Bei der Fibrosierung handelt es sich um einen dynamischen, pathologischen Prozess, der eine Vielzahl zellulärer und molekularer Interaktion umfasst. Auf zellulärer Ebene spielen hier Kupffer-Zellen, Stellatzellen (HSC) und T-Helferzellen vom Typ 2 (Th2) eine entscheidende Rolle. Auf molekularer Ebene steuern profibrotische Faktoren wie *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming-growth factor-β1* (TGF-β1) und IL-13 die Fibrosierung. Es kommt zur Ablagerung von extrazellulärer Matrix (EZM) im extrazellulären Raum und gleichzeitig zur Verminderung des Abbaus der EZM (Knittel *et al.* 1998; Ramadori & Saile 2004; Parola & Pinzani 2009; Iredale 1997). Eine Steigerung dieser Prozesse in Kombination mit gestörter Regeneration und Reparatur des Lebergewebes führt in vielen Fällen zur Zerstörung der Leberarchitektur mit einhergehendem Funktionsverlust und im Endstadium möglicherweise zur Leberzirrhose.

2.2.1 Die Fibrogenese

Die Fibrosierung der Leber wird zunächst durch die Schädigung von Hepatozyten eingeleitet (Abb. 8). Nekrotische oder apoptotische Zellen werden ersetzt. Dieser Regenerationsprozess geht mit einer Entzündungsreaktion einher. Diese führt zur Rekrutierung und Aktivierung gewebsständiger Makrophagen, den Kupffer-Zellen. Ist

das Gewebe anhaltend geschädigt, wird es durch Bindegewebe (überwiegend Kollagen Typ I) ersetzt (Lee & Friedman 2011). Die Verteilung des Bindegewebes in der Leber hängt von der Art der schädigenden Noxen ab. Während einer viralen Infektion wird Bindegewebe um die Portalfelder herum angelagert. Eine Alkohol-induzierte Leberfibrose führt zur Akkumulation extrazellulärer Matrix (EZM) in den feinen Lebersinusoiden. Die Aktivierung von Kupffer-Zellen führt zur Transformation hepatischer Sternzellen (HSC, Stellatzellen). Im unaktivierten Zustand dienen Stellatzellen mit ihren großen Vakuolen, als Fett- und Vitamin-A-Speicher (Ito-Zellen) und residieren im Disse-Spalt (Kisseleva & Brenner 2011). Werden Stellatzellen aktiviert, verändern sie ihren Phänotyp zu einem myofibroblasten-ähnlichen Aussehen, verlieren ihre Vitamin-A-Speicher, proliferieren, sind kontraktile und können zum Entzündungsherd migrieren. Sie stellen nun die Hauptproduzenten der EZM dar, wobei Kollagen Typ I die häufigste Narbensubstanz ist (Rippe *et al.* 1997; Stefanovic *et al.* 2004). Der hauptsächlich von Kupffer-Zellen sezernierte PDGF gilt als Initiatorzytokin zur Stellatzellaktivierung (Pinzani 2002; Borkham-Kamphorst *et al.* 2007), während das profibrotische Zytokin TGF- β 1 die Kollagensynthese anregt. Des Weiteren entscheidet eine gestörte Matrixdegradation über das Entstehen einer Fibrose. Aktivierte Stellatzellen produzieren Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und ihre Inhibitoren (*tissue inhibitors of matrixmetallo proteinases*, TIMP). Interstitielles Kollagen (Typ I und III) wird durch die MMPs MMP 1, 8 und 13) abgebaut. Allerdings erhöht sich mit steigender MMP-Expression auch die Expression ihrer Inhibitoren (TIMP-1).

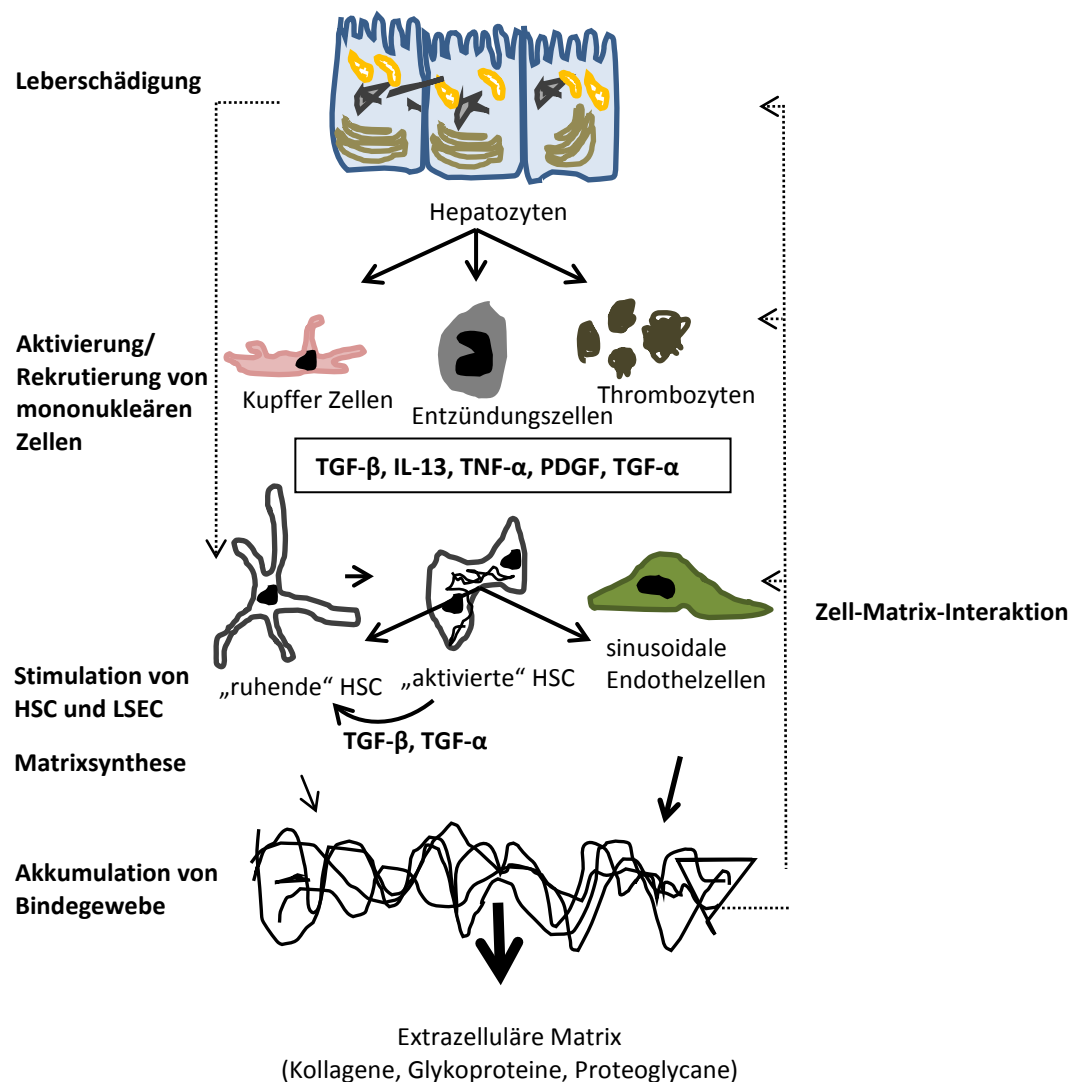


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Leberfibrosierung (nach Knittel *et al.* 1998)

2.2.2 Cholestase und Gallensäuretherapie

Gallensäuren sind hydrophile Cholesterinderivate bzw. Cholesterinabbauprodukte, die in den Hepatozyten durch Zytochrom P450 gesteuerte Oxidation aus Cholesterin gebildet werden und in erster Linie dem Fettverdau, der Ausscheidung schwer löslicher Substanzen und Schwermetalle dienen. Der Gallensäurepool des Menschen besteht hauptsächlich aus fünf Gallensäuren: Cholsäure, Chenodeoxycholsäure, Deoxycholsäure, Lithocholsäure und Ursodeoxycholsäure. Im Körper liegen diese in konjugierter Form vor (Taurin- oder Glycinkonjugate). Die Konjugation erhöht die Wasserlöslichkeit und verhindert die Reabsorption in die Hepatozyten. Man unterscheidet primäre (Cholsäure und Chenodeoxycholsäure) und sekundäre Gallensäuren (Deoxycholsäure und Lithocholsäure). Letztere entstehen durch eine zusätzliche bakterielle Modifikation (7 α -Dehydroxylation) im Darm.

Primäre und sekundäre Gallensäuren unterliegen der Enterohepatischen Zirkulation. 80% der in den Darm abgegebenen Gallensäuren werden im terminalen Ileum resorbiert und über die Pfortader zurück zur Leber transportiert. Der Gallensäurepool kann auf diese Weise bis zu vier Mal täglich zirkulieren (Cohen *et al.* 2011). Durch einen gestörten Abfluss der Galle in den Darm kann es zu einem Rückstau (Cholestase) der Gallensäuren kommen (Zollner & Trauner 2008). Hier unterscheidet man die intra- und die extrahepatische Cholestase. Die Ursachen für die extrahepatische Cholestase liegen oft in einem mechanisch gestörten Abfluss der Galle durch Gallensteine oder Tumoren (Caudel *et al.* 2011). Die Ursachen für die intrahepatische Cholestase sind vielfältiger. So sind häufig Erkrankungen wie die chronisch destruierende nicht-eitrige Cholangitis (Primär biliäre Zirrhose, PBC) oder die Primär sklerosierende Cholangitis an ihrer Entstehung beteiligt. Eine gestörte Gallesekretion führt zur Ansammlung toxischer Gallensalze in den Hepatozyten und letztendlich zur Apoptose von Zellen (Penz-Österreicher *et al.* 2011). Zur Beseitigung dieser „toxischen Galle“ und zur Therapie cholestatischer Lebererkrankungen werden häufig hydrophilere Gallensäuren im Überschuss verabreicht, um den „toxischen Gallensäurepool“ zu neutralisieren.

2.2.2.1 Ursodeoxycholsäure

Ursodeoxycholsäure (UDCA, $C_{24}H_{40}O_4$, z.B. Ursofalk[®]) ist eine tertiäre, Dihydroxy-Gallensäure, die hauptsächlich beim chinesischen Schwarzbären vorkommt. In der traditionellen chinesischen Medizin hat die Behandlung von Lebererkrankungen mit getrockneter Bärengalle bereits vor hundert Jahren große Bedeutung erlangt. In den 1980er Jahren wurde von einer japanischen Arbeitsgruppe erstmals über die Fähigkeit von UDCA, kleinere Gallensteine aufzulösen, berichtet (Makino & Nakagawa 1978). Heute weiß man, dass die Therapie mit UDCA die Heilung chronischer Lebererkrankungen, z.B. der Primär biliären Zirrhose, der Nichtalkoholischen Steatohepatitis und der Alkoholhepatitis (Paumgartner 2010) unterstützt. Die vielfältige Wirkungsweise dieser hydrophilen, tertiären Gallensäure und deren molekularer und zellulärer Hintergrund ist Bestandteil zahlreicher Untersuchungen (Puhl & Beuers 2005; Lindor 2011; Trauner *et al.* 2010; Marschall *et al.* 2011). Die Wirkungsweise von UDCA wird auf unterschiedliche Faktoren zurückgeführt. Aufgrund ihrer Hydrophilie ist UDCA in der Lage, die Komposition der Galle zu verändern. Hydrophobe toxische Gallensäuren wie Chenodeoxycholsäure

und Cholsäure sind primäre Gallensäuren des Menschen und hier am stärksten vertreten, während UDCA nur etwa 3% des menschlichen Gallensäurepools ausmacht. Durch die Gabe von UDCA wird das natürliche Verhältnis des Gallensäurepools hin zur hydrophileren Galle verschoben, wodurch die vielfältigen Wirkungsmöglichkeiten von UDCA greifen können. Die Ursache vieler Lebererkrankungen ist eine Fehlkomposition der Gallenflüssigkeit und deren Abtransport. Die Gabe der hydrophilen Gallensäure UDCA im Überschuss führt zur Anregung des Galleflusses und zu einer hydrophileren Galle, was vor allem dem Schutz der Hepatozyten und Cholangiozyten dient. Die molekulare Beeinflussung hepatobiliärer Transportsysteme durch UDCA, wodurch u.a. cholestatisch erhöhte Serumspiegel normalisiert werden können, wird ebenfalls diskutiert (Trauner *et al.* 2005). Ein weiterer Erklärungsansatz beschäftigt sich mit der Frage der Modulation von Immunantworten durch UDCA (Hillaire *et al.* 1994). Durch UDCA-Gabe wird die Expression der MHC-Klasse-I Moleküle auf Hepatozyten durch Unterdrückung der IFN- γ Produktion reduziert (Saeki *et al.* 1995). Darüber hinaus moduliert UDCA die Produktion von Immunglobulinen (IgM, IgA, IgG) und Zytokinen (IL-2, IL-4) durch immunkompetente Zellen (Yoshikawa *et al.* 1992).

2.2.2.2 24-*nor*-Ursodeoxycholsäure

Eine Seitenkettenreduktion von UDCA führt zu einem noch hydrophileren Seitenkettenderivat (Abb. 9). 24-*nor*-Ursodeoxycholsäure (*nor*UDCA) besitzt eine Methylgruppe weniger als UDCA, was zu einem veränderten Metabolismus und zu veränderten physiologischen Eigenschaften führt.

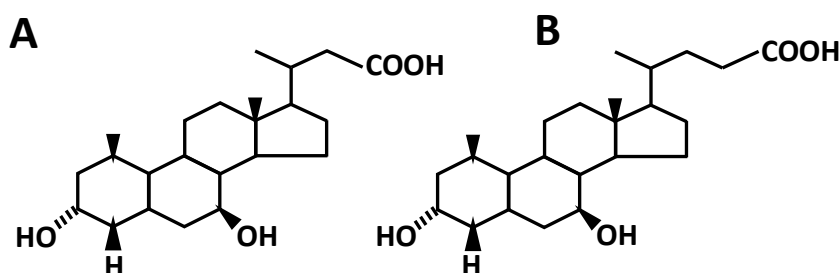


Abbildung 9: Strukturformeln von *nor*UDCA (A) und UDCA (B) (Hofmann *et al.* 2005).

*Nor*UDCA wird im Gegensatz zur UDCA zum großen Teil in unveränderter Form (nicht konjugiert mit Glycin oder Taurin) in die Galle sezerniert. Des Weiteren

durchläuft *norUDCA* einen Kreislauf, der sich vom normalen Enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren unterscheidet. Das so genannte „cholehepatic shunting“ führt zu einer Reabsorption von *norUDCA* durch die Cholangiozyten, einem Rücktransport zu den Hepatozyten und einer erneuten Sekretion (Hofmann *et al.* 2005; Fickert *et al.* 2006). Die intrahepatische Konzentration von *norUDCA* ist aufgrund dieses „shunts“ sehr hoch. Durch die verbesserten hydrophilen Eigenschaften wurde postuliert, dass *norUDCA* noch stärkere antiinflammatorische und antifibrotische Eigenschaften besitzt als UDCA. Dies bewies sich erstmalig im *multidrug resistance 2 knockout* (Mdr2^{-/-}) Mausmodell. Diesen Mäusen fehlt die kanalikuläre Phospholipid Flippase Mdr2, wodurch sie unfähig sind, Phospholipide zur Formation gemischter Mizellen mit toxischen Gallensäuren zu bilden. Die freien toxischen Gallensäuren verursachen das klinische Bild der Primär sklerosierenden Cholangitis. Durch *norUDCA* - Fütterung dieser Mäuse konnte im Vergleich zu UDCA ein starker Rückgang der Entzündung, der Fibrose und letztendlich eine Reversion der Gallengangs- und Leberschädigung erzielt werden (Fickert *et al.* 2006).

Das Schistosomen-Mausmodell bietet eine sehr gute Möglichkeit, die Regulation von Entzündung und Fibrose zu verfolgen (Andrade 2009). Über eine Gallensäurebehandlung der Schistosomiasis ist bislang wenig bekannt. Lediglich ein Fallbericht beschreibt verbesserte Leberwerte bei infizierten Patienten nach einer UDCA-Therapie (de Ribeiro *et al.* 2005).

2.2.2.3 Farnesoid X Rezeptor

Der Farnesoid X Rezeptor (FXR, NR1H4, Gallensäurerezeptor) gehört zur Familie der Kernrezeptoren (Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren) und erhielt seinen Namen durch die ursprüngliche Beobachtung seiner Aktivierung durch mikromolare Mengen von Farnesol-Derivaten (Makishima *et al.* 1999). Heute ist bekannt, dass es sich bei FXR um einen Gallensäure-aktivierten Transkriptionsfaktor handelt, der hauptsächlich in Geweben exprimiert ist, die einem direkten Gallensäurekontakt im enterohepatischen Kreislauf ausgesetzt sind, wie Leber, Darm und Gallenblase (Parks *et al.* 1999). Aber nicht nur Gallensäuren, hier hauptsächlich die primäre Gallensäure Chenodeoxycholsäure (CDCA) (Wang *et al.* 1999), sondern auch mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Zhao *et al.* 2004), lipophile Vitamine, Vorstufen von Gallensäuren (Nishimaki-Mogami *et al.* 2004) und synthetische Substanzen

agieren als potente Liganden von FXR (Maloney *et al.* 2000; Pellicciari *et al.* 2002). FXR stellt in seiner Funktion als Regulator im Gallensäuremetabolismus in Zusammenarbeit mit anderen Kernrezeptoren einen sensiblen Sensor für intrahepatische Gallensäurespiegel dar, deren Neusynthese über einen negativen Rückkopplungsmechanismus gehemmt wird (Holt *et al.* 2003). Neben der Gallensäureregulation ist FXR auch am hepatischen Fett- und Glukosestoffwechsel beteiligt (Trauner *et al.* 2010; Fiorucci *et al.* 2012).

In der vorliegenden Arbeit wird die Funktion des FXR als Modulator der Leberfibrose untersucht. Unterschiedliche Arbeiten belegen das antifibrotische Potential von FXR in Bezug auf die Hemmung der Stellatzell-Aktivierung durch PPAR- γ und eine FXR-Shp-abhängige Signalkaskade (Wagner *et al.* 2011; Renga *et al.* 2011; Fiorucci *et al.* 2005). Untersuchungen an FXR knockout Mäusen (*S. mansoni* infiziert und uninfiziert) sollen in dieser Arbeit Aufschluss darüber geben, inwieweit der FXR an der Ausbildung der hepatischen Fibrose im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion beteiligt ist.

2.2.3 Antifibrotische Therapien in der *Schistosoma mansoni* Infektion

Eine antihelminthische Therapie der *S. mansoni* Infektion führt in den meisten Fällen zur Reduktion oder Beseitigung der Wurmlast und somit zur Verringerung der Eiablage. Auch die Leberschädigung (periportale Fibrose; Pfeifenstiel-Fibrose), die aufgrund der starken immunologischen Reaktionen auf die Ei-Antigene (Granulombildung) hervorgerufen wurde, ist in vielen Fällen reversibel. Unterschiedlichste Studien belegen, dass eine Beseitigung der Würmer auch zu einer Verbesserung bis Ausheilung der Leberschädigung führen kann (Bergquist 2010; McManus *et al.* 2010; Doenhoff *et al.* 2009).

Ist die Leber allerdings durch eine anhaltende, chronische Infektion mit einer hohen Parasitämie zu stark geschädigt, ist eine Leberfibrose nicht mehr reversibel (Berhe *et al.* 2007; Richter *et al.* 2000; Tanaka *et al.* 1992). Die Steuerung der Ausheilung hängt von vielen Faktoren ab. Hierzu gehören das Geschlecht, das Alter und die genetische Veranlagung der Patienten (Booth *et al.* 2004; Badawi *et al.* 1995). In jedem Fall wird in Bezug auf die Reversibilität einer Leberfibrose durch die alleinige Beseitigung der schädigenden Noxe ein „point of no return“ diskutiert

(Ramachandran *et al.* 2009; Henderson & Iredale 2007). Dieser Punkt bedeutet, dass selbst nach Beseitigung der schädigenden Noxe die Fibrosierung der Leber irreversibel und voranschreitend geworden ist. Folgen der Fibrosierung der Leber sind häufig portaler Hochdruck, hepatische Enzephalopathie u.a. mit Aszitesbildung oder Varizenblutungen. Diese zum Teil schwerwiegenden Komplikationen bedürfen einer komplexen Therapie. Antifibrotische Therapien gibt es derzeit nicht. Im Schistosomen-Modell wurden allerdings einige Substanzen auf ihre antifibrotische Wirksamkeit untersucht, unter anderem Octreotid (Mansy *et al.* 1998), beta-Amiproprionyl (Giboda *et al.* 1994) und Pentoxifyllin (Reis *et al.* 2001). Auch Silymarin wird diskutiert (El-Lakkany *et al.* 2012). Keine der aufgeführten Substanzen konnte einen deutlichen antifibrotischen Effekt erzielen.

3 Ziel- und Fragestellung

Das Krankheitsbild der Schistosomiasis ist nicht allein durch die Infektion mit dem Helminthen *Schistosoma mansoni* charakterisiert. Vielmehr sind die vom Parasiten produzierten und in den feinen Lebersinusoiden festsitzenden Eier die eigentliche Ursache für die Entstehung der intestinalen Schistosomiasis. Die massive granulomatöse Entzündungsreaktion auf lösliche Eiantigene (SEA) führt zur Granulombildung und zur Fibrosierung der Leber mit zum Teil schwerwiegenden Komplikationen (portaler Hochdruck, Aszites, Ösophagusvarizenblutungen). Eine antihelminthische Therapie (Praziquantel) ist sehr effektiv, befreit von der Wurmlast und führt in frühen Krankheitsstadien zum Rückgang leichter Krankheitssymptome. Die Symptome schwerer und chronischer Krankheitsverläufe bleiben jedoch in den meisten Fällen von der Therapie unbeeinflusst. Hierin besteht die dringende Notwendigkeit einer zusätzlichen antifibrotischen Behandlungsstrategie.

Wirksame antifibrotische Substanzen wären bei einer Schistosomiasis von großem Nutzen, da die Erkrankung häufig erst in einem späten Stadium diagnostiziert wird und eine alleinige antihelminthische Therapie keine Heilung der Leberschädigung bewirken kann. Das Fibrosemodell der *Schistosoma mansoni* Infektion in der Maus ist von großem, wissenschaftlichen Interesse, da die meisten genutzten Fibrosemodelle pathophysiologisch nicht relevant sind (unphysiologische Stimuli, zu starke Gewebeschädigung) oder durch lange Versuchsdauer und große Streuung der Ergebnisse nur unzureichend nutzbar sind. Es existiert zudem bislang kein Modell, das Untersuchungen über die Zusammenhänge zwischen der Cholestase- und Fibrosewechselwirkung zulässt.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Evaluierung neuer und wirkungsvoller Behandlungsstrategien zur Therapie der entzündungs-assoziierten Leberfibrose im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion auf Basis neuartiger Gallensäuren mit hohem antiinflammatorischem und antifibrotischem Potential. Hierzu sollen systematisch folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

3.1 Inwieweit trägt eine Beteiligung/Zerstörung der Gallengänge während einer chronischen *Schistosoma mansoni* Infektion zur Fibrosierung der Leber bei?

Ziel dieser Studie war es, einen mechanistischen Link zwischen der *S. mansoni* Infektion und den zeitabhängigen Veränderungen in der Expression fibroserelevanter Gene zu untersuchen. Die gesteigerte Produktion von Kollagen verbunden mit einer gesenkten Expression proteolytischer Enzyme (z.B. Matrixmetalloproteinasen, MMPs) tragen zur Fibrosierung der Leber bei (Schuppan & Popov 2002, Hemmann *et al.* 2007). Welche Rolle parenchymatische (Hepatozyten) und nicht-parenchymatische Leberzellen (z.B. Gallengangsepithel) bei diesem Vorgang spielen, ist bislang in der *S. mansoni* Infektion nicht untersucht worden. Bekannt ist aber, dass das Mausmodell der *S. mansoni* Infektion durch eine geringe Schädigung der Hepatozyten charakterisiert ist (Andrade 2004). In diesem Punkt unterscheidet sich dieses Modell deutlich von anderen Fibrosemodellen, wie der Tetrachlorkohlenstoff (CCL4) - induzierten Leberfibrose, Gallengangsligatur (BDL, *bile duct ligation*) oder die Leberfibrose in Mdr2 (*canalicular phospholipid export*) knock-out Mäusen (Fickert *et al.* 2006). Zusätzlich sollte die bisher nicht geklärte Funktion des aktivierten Gallengangsepithels als potentieller Schrittmacher der Fibrogenese in der intestinalen Schistosomiasis untersucht werden.

3.1.1 Wie verändert sich die Leberfibrose im zeitlichen Verlauf der *S. mansoni* Infektion?

3.1.2 Wie weit sind parenchymatische und nicht-parenchymatische Leberzellen an der Fibrosierung der Leber beteiligt?

3.1.3 Wie verändert sich die Gallengangsarchitektur im zeitlichen Verlauf der *S. mansoni* Infektion?

3.1.4 Handelt es sich bei der intestinalen Schistosomiasis um eine cholestatische Lebererkrankung?

3.2 Stellt der Farnesoid X Rezeptor während der *Schistosoma mansoni* Infektion einen Schlüsselmoment in der Entstehung der Leberfibrose dar?

Die Funktion des Gallensäure-Kernrezeptors FXR (Farnesoid X Rezeptor) liegt hauptsächlich in der Regulation des Gallensäurestoffwechsels. Hier fungiert er als

negativer Feedback-Regulator, d.h. ein zu großer Gallensäuregehalt hemmt die Synthese von FXR (Parks *et al.* 1999). Die antifibrotische Wirkung von FXR-Liganden wird derzeit diskutiert (Fiorucci *et al.* 2004). Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit dem FXR-Liganden *6-ethyl chenodeoxycholic acid* (6-ECDCA) zu einer erhöhten Apoptose-Rate hepatischer Stellatzellen führte und die Expression profibrotischer Gene herunterreguliert wurde. In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass FXR-/- Mäuse durch die fehlende FXR-Regulation von NF- κ B (*nuclear factor* κ B) (Wang *et al.* 2008) zu einer starken Entzündung in der Leber und zu Lebertumoren neigen. Hieraus ergab sich die Fragestellung für diesen Versuchsteil: Wenn eine Stimulation von FXR zum Rückgang der Fibrose führt, verschlechtert im Umkehrschluss das Ausschalten von FXR die hepatische Fibrose? Dies sollte im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion, mit starker entzündungsassoziierter Fibrose, untersucht werden.

3.2.1 Inwieweit kann ein genetischer knock-out von FXR die Fibrosierung der Leber, hervorgerufen durch eine *S. mansoni* Infektion, beeinflussen?

3.2.2 Kann eine FXR-Aktivierung durch einen spezifischen Liganden (Chenodeoxycholsäure) die Fibrosierung der Leber im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion verhindern?

3.3 Beeinflusst die Behandlung mit *nor*UDCA die Granulombildung und die Leberfibrose im chronischen Krankheitsstadium der *Schistosoma mansoni* Infektion?

Nach der Charakterisierung des Mausmodells und der Untersuchung der FXR-Funktion sollte nun versucht werden, einen möglichen Therapieansatz zu etablieren. Hierzu diene die neue, künstliche Gallensäure 24-*nor*-Ursodeoxycholsäure (*nor*UDCA). Wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, führt eine chemische Modifikation der Hauptschubstanz Ursodeoxycholsäure (UDCA) zu einem veränderten Metabolismus und anderen physiologischen Eigenschaften. Die Wirksamkeit von *nor*UDCA wurde bereits in einem Mausmodell mit cholestatischem Hintergrund der Lebererkrankung (Mdr2-/-: Primär sklerosierende Cholangitis, Fickert *et al.* 2006) unter Beweis gestellt. Für diese Versuche wurde nun postuliert, dass *nor*UDCA auch in einem entzündungsassozierten Fibrosemodell (*S. mansoni* Infektion) ohne primär biliären Hintergrund wirksam ist.

3.3.1 Zeigen die beiden Gallensäuren Ursodeoxycholsäure und 24-*nor*-Ursodeoxycholsäure antiinflammatorische und/oder antifibrotische Wirkung in der intestinalen Schistosomiasis?

3.3.2 Inwieweit wirkt sich die erhöhte Hydrophilie der künstlichen Gallensäure 24-*nor*-Ursodeoxycholsäure und der damit verbundene veränderte Metabolismus auf die antiinflammatorischen und/oder antifibrotischen Fähigkeiten aus?

3.3.3 Wie stellt sich der Wirkmechanismus der beiden Gallensäuren im Vergleich zueinander dar?

4 Material und Methoden

4.1 Mäuse und Parasiten

4.1.1 Genetischer Hintergrund der Versuchstiere

Der in dieser Arbeit genutzte Schistosomen-Mauszyklus ist seit über 40 Jahren in der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsklinik Rostock etabliert. Er basiert auf einem mit *S. mansoni* Mirazidien infizierten südamerikanischen Stamm von Süßwasserschnecken der Gattung *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata*, Puerto Rico), einem südafrikanischen Stamm *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*, Mozambique) und weiblichen NMRI-Mäusen (*Mus musculus*, Harlan & Winkelmann, Horst, Netherlands). Bei den NMRI-Mäusen handelt es sich um einen sehr robusten Auszuchtstamm mit einem ursprünglichen Swiss-albino Hintergrund. Im zweiten Versuchsteil dieser Arbeit wurden Mäuse mit verändertem genetischen Hintergrund und den entsprechenden Wildtyp-Mäusen verwendet. Diesen Mäusen fehlt der Farnesoid-X-Rezeptor (FXR^{-/-}, C57/BL6; Frank J. Gonzalez, National Cancer Institute of Health, Bethesda, MD).

4.1.2 Haltung der Versuchstiere

Die Schnecken wurden in gefiltertem Aquariumwasser bei 26°C Raumtemperatur gehalten und erhielten Kopfsalat als Nahrung. Die Haltung der Mäuse erfolgte in Zehnergruppen mit Standardfutter (ssniff R/M-H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany), Leitungswasser *ad libitum*, einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 26°C und einem 12 h Tag/Nacht Rhythmus. Alle im Rahmen der Promotionsarbeit durchgeführten Tierversuche wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (Aktenzeichen LVL M-V/TSD/7221.1.3-1.1-43/05 LALLF; M-V/TSD/7221.3-1.1-006/08).

4.1.3 Infektion der Schnecken und Mäuse

Sechs bis acht Wochen alte, weibliche NMRI- oder C57/BL6-Mäuse dienten im Schistosomen/Maus-Zyklus als Endwirt und *B. glabrata* Süßwasserschnecken als Zwischenwirt. *S. mansoni* infizierte Schnecken wurden zunächst einzeln in Reagenzgläsern mit Aquariumwasser für 90 min abgedunkelt und anschließend starkem Licht ausgesetzt. Dieser Lichtreiz führt zur Massenausscheidung von Zerkarien, den infektiösen *S. mansoni* Larven. Die Anzahl der Zerkarien/ml Wasser wurde mikroskopisch bestimmt und anschließend in Bechergläsern (Volumen 1Liter)

mit 200 ml Wasser auf 50 Zerkarien/ml verdünnt. Anschließend wurden die Mäuse für eine Stunde in diesem Wasserbad infiziert (Sitzbad, Paddelmethode). Die Zerkarien orientieren sich im Wasser chemotaktisch und dringen über die im Wasser befindliche, unbehaarte Haut (Fußsohlen und Schwanz) in den Endwirt ein.

In dieser Arbeit wurden alle Versuchstiere mit 50 Zerkarien infiziert, sofern es in der beschriebenen Methode (4.1.4) nicht anders dargestellt wurde.

4.2 Infektions- und Futterprotokolle

Die vorliegende Arbeit teilt sich experimentell in drei Versuchsansätze mit unterschiedlichen Infektions- und Futterprotokollen:

4.2.1 Versuchsteil A: Der zeitliche Verlauf der chronischen *Schistosoma mansoni* Infektion

Um die Entwicklung des Krankheitsbildes der chronischen Schistosomiasis im zeitlichen Verlauf betrachten zu können, wurden jeweils 5 mit 50 Zerkarien infizierte NMRI-Mäuse zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion (*post infectionem*, pi) aufgearbeitet (Abb. 10).

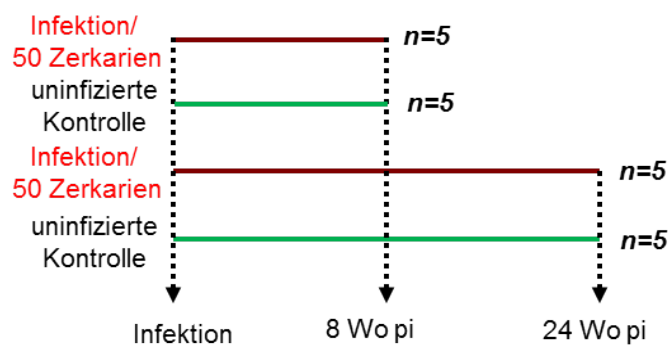


Abbildung 10: Versuchsaufbau A – Der zeitliche Verlauf der chronischen *S. mansoni* Infektion

4.2.2 Versuchsteil B: Die Rolle des Farnesoid X Rezeptors in der granulomatösen Leberfibrose der *Schistosoma mansoni* Infektion

Dieser Versuchsaufbau umfasst 20 weibliche, 6 Wochen alte C57/BL6-Mäuse (10 FXR+/+ und 10 FXR-/-). Jeweils 5 FXR+/+ Mäuse und 5 FXR-/- Mäuse wurden mit 50 *S. mansoni* Zerkarien infiziert (Abb. 11).

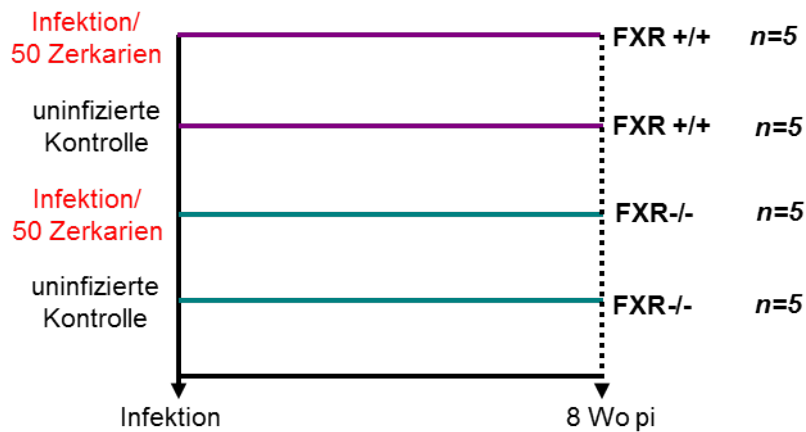


Abbildung 11: Versuchsaufbau B – Die Rolle des Farnesoid X Rezeptors in der *S. mansoni* Infektion

4.2.3 Versuchsteil C: Gallensäuretherapie

23 NMRI-Mäuse (weiblich, 6 Wochen alt) wurden in folgende Gruppen aufgeteilt:

Naive – gesunde Kontrolle, ohne Infektion und ohne Therapie

Kontrolle – mit *S. mansoni* infizierte Kontrolle

0,5% *nor*UDCA – infiziert mit 4-wöchiger 0,5% *nor*UDCA-Fütterung

0,5% UDCA – infiziert mit 4-wöchiger 0,5% UDCA-Fütterung

Die Gallensäurefütterung begann 12 Wochen nach einmaliger Infektion. Die beiden Gallensäuren wurden in Pulverform (0,5% wt/wt) dem Standardfutter (Ssniff Haltungsfutter für Mäuse in Mehlform, Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) beigemischt (Abb. 12).

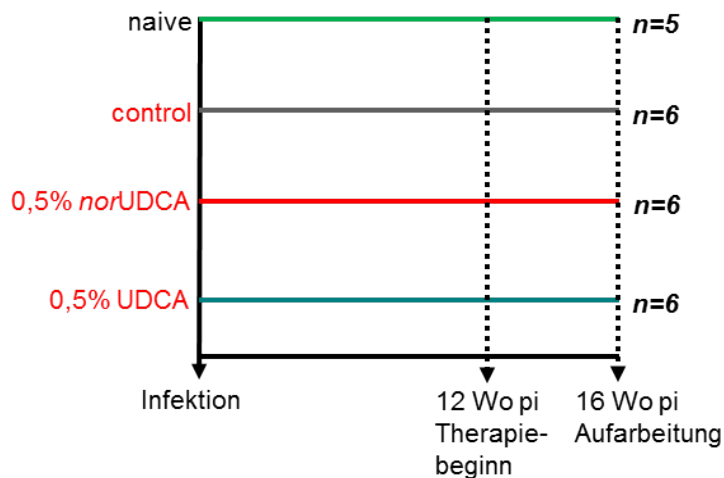


Abbildung 12: Versuchsaufbau C – Gallensäuretherapie

4.3 Euthanasie und Aufarbeitung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden durch die intraperitoneale Injektion von 400 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital-Natrium (Narcoren®) getötet. Anschließend wurde durch das Durchtrennen der Hauptschlagader das Blut entnommen. Das gewonnene Blut wurde 15min bei 1500rpm zentrifugiert, das Serum anschließend abpipettiert und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Milzen, Nieren und Teile der Lebern wurden in 2-Methylbutan (Isopentan, vorgekühlt in flüssigem Stickstoff) eingefroren und bis zur Verarbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert. Definierte Teile des linken und des rechten Leberlappens wurden bis zur Paraffineinbettung in 4% neutral gepuffertem Formaldehyd fixiert. Zur Generierung von Makrophagen und dendritischen Zellen und zur Isolation von T-Lymphozyten (siehe 4.5 und 4.6) wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet.

4.4 Analyse der Infektionsmarker

4.4.1 *Schistosoma mansoni* Antikörnernachweis

Die serologische Diagnostik zum Nachweis von *S. mansoni* spezifischen Antikörpern wurde mittels eines kommerziell erwerblichen ELISA-Kits (*enzyme-linked immunosorbent assay*, IVD Research Inc., Carlsbad, CA) durchgeführt. Der Test wurde den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt. Der cut-off Wert (Grenze zwischen positivem und negativem Testergebnis) lag bei einer OD<0,2 (*optical density*, OD). Die Sensitivität dieses Tests liegt bei 100% und hat eine Spezifität von 85% (laut Herstellerangaben). Sämtliche Proben wurden im Doppelansatz analysiert und als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

4.4.2 Mikroskopische Auszählungen der Eigranulome

Von den Lebern aller Versuchstiere wurden zur Erfassung der Infektionslast histologische Schnitte definierter Leberstücke angefertigt. Die Auszählung der Eigranulome erfolgte anschließend mikroskopisch in jeweils 30 Sichtfeldern pro Leberschnitt.

4.4.3 Serumbiochemie

Die Werte der Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), der Alkalischen Phosphatase (AP) und der Gallensäuren wurden im Serum bestimmt, um eine Aussage über den Grad der Leberschädigung machen zu können. Während

erhöhte Werte der Transaminasen ALT und AST eine Schädigung der Hepatozyten und Gallengänge anzeigen, deutet eine Erhöhung der AP auf cholestatische Bedingungen in der Leber hin. Die Serumproben wurden mit einem Hitachi-917 Fotometer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) analysiert.

4.5 mRNA Expressionsanalysen

Zur Expressionsanalyse proinflammatorischer und profibrotischer Gene wurden quantitative mRNA-Messungen (Real-time PCR) durchgeführt.

4.5.1 RNA-Isolation

Zur Homogenisierung wurden kryokonservierte Leberstückchen zunächst in 800µl TRIzol® (Invitrogen, Österreich) aufgenommen und in spezielle Tubes überführt. Diese Tubes enthielten Keramik-Beads (MagNa Lyser Green Beads, Roche), welche während der nachfolgenden Zentrifugation zur Homogenisierung der Leberstücke führten. Zentrifugiert wurde im MagNa-Lyser (Roche) zweimal für 15sek bei 6500rpm. Zwischen den Zentrifugationsschritten wurden die Proben zum Abkühlen auf Eis gestellt. Anschließend wurden 200µl Chloroform zu jeder Probe pipettiert, welche dann in einem Rotationsrad im Kühlraum bei 4°C für 10min inkubierten. Dann wurden die Proben zentrifugiert (30min, 13.000rpm, 4°C). Die obere wässrige Phase des dreiphasigen Gemisches wurde jeweils in frische 1,5ml Röhrchen mit 5µl Isopropanol überführt. Nach 10min Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert (13.000rpm, 15min, 4°C). Das Zellpellet wurde anschließend in 75% Ethanol gewaschen und wieder zentrifugiert (13.000rpm, 15min, 4°C). Nachdem das Pellet luftgetrocknet war, wurde es, je nach Größe des Pellets in 25-100µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Zur Sicherstellung der RNA-Stabilität bzw. Qualität wurde jeweils ein Aliquot der RNA-Proben mittels eines Checkgels auf klare Bandenbildung überprüft. Der RNA-Gehalt der Proben wurde über ein Spektrofotometer (Eppendorf, BioPhotometer) bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen.

4.5.2 Reverse Transkription und SYBR Green-Analyse

Zur Quantifizierung der RNA wurde die Real-Time Reverse Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) verwendet. Dazu wurden jeweils 1,5µl der gewonnenen RNA zunächst in cDNA mittels SuperSript TM II Reverse Transkriptase (Invitrogen, Österreich) im MyCycler (BIORAD) umgeschrieben (Protokoll Zyklen, Anhang

4.5.2a). Als Primer dienten 0,4µl Randomhexamer. Nach Zugabe der Primer und 10µl Aqua dest. wurden die Proben bei 65°C denaturiert. Danach erfolgte die Zugabe des Mastermixes bei 42°C (Mastermix, Anhang 4.5.2b). Nach 20facher Verdünnung der cDNA wurde diese im ABI PRISM 7900HT Detection System (Thermocycler mit Spectrograf, CCD-Kamera, *charge-coupled device*) amplifiziert (Zusammensetzung der cDNA-Mastermix Ansätze und Real-Time PCR Zyklen; Anhang 4.5.2c). Als Fluorochrom diente SYBR Green I (Morrison *et al.* 1998). Die CT-Werte (Threshold-Cycle) wurden mittels ABI PRISM 7900HT SDS Software analysiert und gegen eine Standardkurve aus cDNA einer Kontrollgruppe mit bekannter RNA-Konzentration vermessen (Dissertation Aitak Farzi 2009). In Tabelle 2 sind die analysierten Gene und deren Primersequenzen zusammengefasst. Die gemessenen RNA-Expressionen wurden als relative Werte (%) zur Expression eines Referenz-Gens (*housekeeping-gen*) 36b4 oder Gapdh ausgedrückt.

Tabelle 2: Real-time PCR Primer-Sequenzen (5'-3')

RNA	Forward Primer	Reverse Primer
36b4	5'-AGATGCAGCAGATCCGCA-3'	5'-GTTCTTGCCCATCAGCACC-3'
Gapdh	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	5'-TGGCAGTGATGGCATGGA-3'
Col1a2	5'-GCAGGGTTCCAACGATGTTG-3'	5'-GCAGCCATCGACTAGGACAGA-3'
IFN-γ	5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3'	5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3'
IL-1β	5'-CTGGTGTGTGACGTTCCCATTA-3'	5'-CCGACAGCACGAGGCTTT-3'
iNOS	5'-ACATCAGGTCGGCCATCACT-3'	5'-CGTACCGGATGAGCTGTGAATT-3'
MMP-2	5'-CTTTGAGAAGGATGGCAAGTATGG-3'	5'-TTGTAGGAGGTGCCCTGGAA-3'
TGF-β1	5'-TGACGTCACTGGAGTTGTACGG-3'	5'-GGTTCATGTCATGGATGGTGC-3'
TIMP-1	5'-CATGGAAAGCCTCTGTGGATATG-3'	5'-AAGCTGCAGGCATTGATGTG-3'
iNOS	5'-CAGAGCCCTCAGCAGCATCCA-3'	5'-CAGGTGTTCCCCAGGCAGG-3'

PCR, Polymerase-Kettenreaktion; 36b4, acidic ribosomal phosphoprotein P0; Gapdh, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Col1a2, procollagen 1a2; IFN-γ, Interferon-gamma; IL-1β, Interleukin-1β; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MMP-2, Matrix metalloproteinase-2; TGF-β1, transforming-growth factor-β 1; TIMP-1, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase; iNOS, inducible oxide synthase.

4.6 Charakterisierung der Leberfibrose

4.6.1 Hydroxyprolin-Assay

Zur Quantifizierung des Fibrosegehalts in der Leber wurde die Menge der nicht-essentiellen Aminosäure Hydroxyprolin (L-4-Hydroxyprolin, HP) gemessen. Hydroxyprolin ist die hydroxylierte Form der Aminosäure Prolin und kommt in großen Mengen im Bindegewebe vor. Hier stabilisiert es die Kollagen-Tripelhelices. Die Analyse des Hydroxyprolingehaltes eines Gewebes basiert auf der Aufreinigung der Aminosäure und ihrer Messung gegenüber einem Standard. Für die Analysen wurden je 200mg kryokonservierte Leber in 4ml 6N HCl homogenisiert (Homogenisierung/Pottern bei 1100rpm, z.B. 387mg Leber in 7,74ml 6N HCl). Das homogenisierte Gewebe wurde in Reagenzgläser (Glasröhrchen mit Verschluss, hitzestabil) überführt und für 16-24h bei 110°C inkubiert. Anschließend wurde das Probenlysat über Faltenfilter in 1,5ml Tubes mit Citrat-Acetate-Puffer gefüllt und mittels 2,2%iger NaOH neutralisiert. Die Verdünnung des Hydroxyprolin-Standards (Sigma-Aldrich) wurde in folgenden Verdünnungsschritten angesetzt:

Tabelle 3: Verdünnungsschritte des Hydroxyprolinstandards

Standard 1	3µg	500µl Gebrauchslösung
Standard 2	1,5µg	500µl Gebrauchslösung + 500µl Citrat-Acetate-Puffer
Standard 3	0,75µg	500µl Std.2 + 500µl Citrat-Acetate-Puffer
Standard 4	0,375µg	500µl Std.3 + 500µl Citrat-Acetate-Puffer
Standard 5	0,1875µg	500µl Std 4 + 500µl Citrat-Acetate-Puffer
Standard 6	0,09375µg	500µl Std5 + 500µl Citrat-Acetate-Puffer (→ 500µl verwerfen)

Stocklösung: 5mg Hydroxyprolin in 1ml A. dest; Gebrauchslösung: 12µl Stocklösung + 10ml Citrat-Acetate-Puffer

Anschließend wurden 250µl Chloramin-T-Lösung zu allen Proben pipettiert und 20min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Darauf folgten zwei weitere Inkubationschritte mit 250µl Perchlorsäure (12min, RT) und 250µl Dimethylbenzaldehyd-Lösung (20min, 60°C). Abschließend wurden die Proben in Küvetten (Quarzglas-Küvetten, 1cm) überführt und im Spektrofotometer bei einer Wellenlänge von 565nm gemessen.

4.6.2 Leberhistologie

Standardisierte Leberstücken wurden in 4% neutral gepuffertem Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 4µm dicke Leberschnitte angefertigt und zum einen mit Hämatoxylin/Eosin (HE, Anhang 4.6.2a) und zum anderen zum Anfärben des Kollagens mit Sirius Red (SR, Anhang 4.6.2b) gefärbt.

4.6.3 Fibrose-Score

Die codierten Leberschnitte wurden von einem Pathologen der Medizinischen Universität Graz unter „Blindbedingungen“ ausgewertet. Hierzu wurde ein semi-quantitatives, humanes Fibrose-Score System verwendet, welches Aussagen über die periportale Ausweitung der Fibrose in der Leber zulässt. Dieser Score (Ishak-Score; Ishak *et al.* 1998) umfasst 6 Stufen:

0 = keine Fibrose; 1 = leichte Fibrose; 2 = leichte/moderate Fibrose; 3 = moderate Fibrose; 4 = starke Fibrose; 5 = unvollständige Zirrhose; 6 = Zirrhose.

4.6.4 Morphometrische Analyse der Granulomgröße

Zur statistischen Auswertung der durchschnittlichen Granulomgröße wurde ein computergestütztes Auswertungsprogramm verwendet (ImageJ, Version 1.41; National Institute of Health, Bethesda, USA). In jeder Probe (ein Leberschnitt pro Versuchstier) wurden auf diese Weise 30 *S. mansoni* Granulome vermessen und ausgewertet.

4.7 Antikörpernachweise

4.7.1 Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Untersuchung wurden 4µm dünne Leberschnitte aus kryokonservierten Proben mittels eines Cryostat-Mikrotoms (HYRAX C 25, Carl Zeiss AG) angefertigt. Dieser Kryostat enthält das Mikrotom unter konstanten Temperaturen im negativen Bereich. Nach dem Schneiden wurden die Kryopräparate fixiert (4% neutral gepuffertes Formaldehyd/Methanol/Aceton) und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt, die in der folgenden Tabelle mit den entsprechenden Verdünnungen aufgelistet sind (Tab. 4).

Tabelle 4: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Detektionsmethode
VCAM-1 (monoclonal, rat anti-CD106)	BD Pharmingen	1:50	ABC-System (DAKO) mit AEC
α-SMA (monoclonal, clone 1A4)	Sigma	1:500	ABC-System (DAKO) mit AEC
CD4 (monoclonal, clone RM4-5)	BD Pharmingen	1:30	ABC-System (DAKO) mit AEC
CD11b (monoclonal, clone M1/70)	BD Pharmingen	1:50	ABC-System (DAKO) mit AEC

4.7.2 Westernblot

Das Prinzip des Westernblots basiert auf der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen und der anschließenden Übertragung der Proteine von einem Acrylamidgel auf eine feste Polymerschicht (z.B. Nitrozellulose-Membran). Zur Detektion der spezifischen Proteine wird dann mit entsprechenden Antikörpern gefärbt. Nach Inkubation mit einem spezifischen Antikörper und dem entsprechenden Antigen kann der Komplex mit einem zweiten enzymkonjugierten Antikörper autoradiographisch mittels eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden.

Zur Proteinaufreinigung wurde zunächst tiefgefrorenes Lebergewebe homogenisiert (Ultra-Turrax) und anschließend zentrifugiert (10.000rpm, 4°C, 5min) um nicht gelöste Zellbestandteile zu entfernen. Der Gesamtproteingehalt der in Laemmli-Puffer gelösten Homogenisate wurde nach Bradford bestimmt (Bradford *et al.* 1976). 1-5µl der Überstände wurde mit jeweils 800µl Aqua dest. aufgefüllt. Anschließend wurde 200µl das Bradford Reagenz hinzugegeben. Die Zugabe dieses Farbstoffs (Coomassie Brilliant Blue R250) verschiebt das Absorptionsmaximum des Reagenz von 465nm auf 595nm. Mit Hilfe eines BSA (bovines Serumalbumin)-Proteinstandards konnte nun der Proteingehalt der jeweiligen Proben am Fotometer SmartSpec 3000 (Bio-Rad, Hertfordshire, UK) gemessen werden. Alle Proben wurden in Dreifachansätzen vermessen. Jedes Zelllysats wurde so mit Probenpuffer verdünnt, dass jede Probe 30µg Protein enthielt und vor dem Auftragen auf das SDS-Gel für 5min bei 95°C denaturiert. Hierbei werden die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgelöst und die Proteine werden gestreckt.

Zusätzlich wurde dem Probenpuffer β -Mercaptoethanol beigemischt zur Auflösung von Disulfidbrücken. Zur späteren Größenzuordnung der Proteinbanden wurde zusätzlich zu den Proben ein Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Das System zur Auftrennung der Proteine wurde entsprechend dem diskontinuierlichen System (diskontinuierliche SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli *et al.* 1970) durchgeführt. Zunächst werden die Proteine in einem 4,5% Sammelgel konzentriert und anschließend in einem 10% Trenngel getrennt. Die Gelelektrophorese erfolgte über 90min in einer Mini-VE Kammer (Mini-Vertikalelektrophorese Kammer) bei konstanten 200V und 30mA. Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf die Blotmatrix erfolgte in einem TransBlot SD (Bio-Rad Laboratories GmbH; Germany). Hierfür wurde die verwendete Poly-Vinyliden-Fluorid-Membran (PVDF-Membran) zunächst zur Aktivierung in Isopropanol getränkt. Der Sandwich-Blot wurde so zusammengesetzt, dass die PVDF-Membran zur Anode und das SDS-Gel zur Kathode gerichtet waren (Abb. 13).

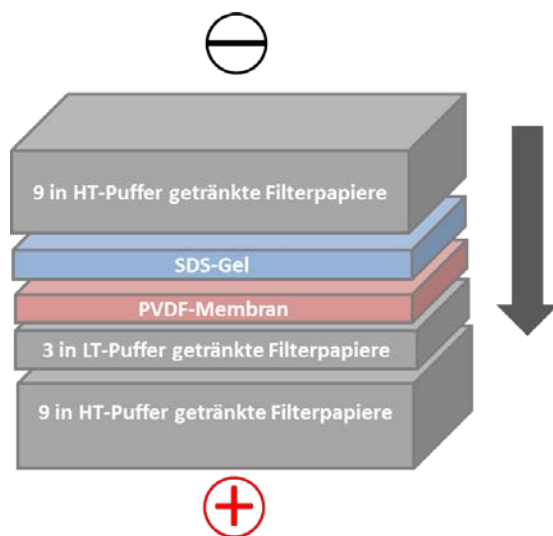


Abbildung 13: Sandwichaufbau im Western Blot

Nach 2h (bei 25V) wurde der Blot beendet und die Membran in Ponceau S gefärbt und anschließend getrocknet. Es folgte eine erneute Aktivierung der Membran in Isopropanol und die Inkubation in Blockmilch (über Nacht, 4°C) um unspezifische Bindungsstellen auf der Membranoberfläche zu vermeiden. Eine anschließende Inkubation mit dem primären Antikörper (verdünnt in Blockmilch) erfolgte bei Raumtemperatur auf einem Schüttler für 2h. Danach wurde die Membran in Waschpuffer gewaschen (4 x 5min auf dem Schüttler).

Der sekundäre, biotinylierte Antikörper (verdünnt in Blockmilch) wurde für 1h hinzugefügt. Nach erneutem Waschen mit Waschpuffer wurde die Membran für 1h mit Streptavidin-POX (verdünnt in Blockmilch) geschwenkt, wieder gewaschen und mit dem Chemilumineszenz-Substrat für 5min im Dunkeln inkubiert. Zum Abschluss wurde die Membran in Folie eingeschweißt und in einer Dunkelkammer für unterschiedliche Zeiten auf einen Röntgenfilm gelegt. Dieser wurde anschließend entwickelt. Die Belichtungszeiten lagen bei GAPDH zwischen 5 und 30sec, bei den zu untersuchenden Proteinen bei 10min. Sämtliche Pufferrezepturen befinden sich im Anhang (Anhang 4.7.2)

4.7.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mittels dieses quantitativen Immunoassays ist es möglich Antikörper im Serum zu detektieren. Die zu ermittelnden Antigene sind auf einem Träger (96-Well-Platte) immobilisiert. Eine Antigen-Antikörperreaktion kommt nach der Inkubation mit einer Serumprobe zustande. Enthält das zu untersuchende Serum keine spezifischen Antikörper, wird das Serum in den anschließenden Waschschritten vollständig entfernt. Nach der Antigen-Antikörperreaktion erfolgt eine zweite Inkubation mit einem zweiten, diesmal mit einem Enzym-gekoppelten, Antikörper. Beim Enzym handelt es sich in den meisten Fällen um Meerrettich-Peroxidase (HRP), Alkalische Phosphatase (AP) oder β -Galaktosidase, welches in der abschließenden Enzym/Substrat-Reaktion colorimetrisch, fluorimetrisch oder luminometrisch sichtbar gemacht wird.

In dieser Arbeit wurden kommerziell erwerbliche ELISA-Kits verwendet (*S. mansoni* soluble egg antigen ELISA Test Kit, IVD Research Inc., Carlsbad, CA; *mouse specific* IL-13 ELISA, eBioscience, San Diego, USA). Die Testsysteme wurden entsprechend den Herstellerangaben mit murinen Serumproben durchgeführt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das eingefrorene Serum vor der Durchführung der Tests nicht mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren wurde. Die Daten der optischen Dichte (OD) wurden als Mittelwerte von Doppelansätzen \pm Standardabweichung dargestellt.

4.8 Generierung von Makrophagen und Dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark

Folgende Arbeiten wurden im Proteom-Zentrum der Universitätsklinik Rostock in der Arbeitsgruppe für Klinische Immunologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke durchgeführt.

4.8.1 Isolation von Knochenmarks-Zellen

Weibliche NMRI-Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurden unter semi-sterilen Bedingungen mit sterilen Scheren und Skalpellen die Hinterbeine enthäutet und Femur und Tibia entnommen. Das Muskelgewebe wurde nun vollständig entfernt und die Knochen an der Gelenkkapsel geöffnet. Mit Hilfe einer Spritze und einer 26G Nadel wurde das Knochenmark in Waschmedium (Anhang 4.8.1a) herausgespült und in einem 50ml Falcon-Röhrchen auf Eis gesammelt. Vor der Aussaat wurden die gewonnenen Zellen zentrifugiert (1300rpm, 10min, 4°C), in Kulturmedium für Makrophagen oder Dendritische Zellen (Anhang 4.8.1b) resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert (37°C, 5% CO₂). Da hämatopoetische Stammzellen bis zur Reife in Suspension vorliegen, konnten diese durch Überführen des Überstandes in eine frische Zellkulturflasche nach 12 h von bereits adhärenenten Fibroblasten getrennt werden. Zur Generation von Makrophagen (BMDMs, *bone-marrow derived macrophages*) wurde dem Medium 40ng/ml murines, rekombinantes M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) beigemischt. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage und nach 7 Tagen konnten die nun adhärenenten Makrophagen geerntet und weiterverarbeitet werden. Dendritische Zellen (BMDCs, *bone-marrow derived dendritic cells*) wurden unter dem Zusatz von 10ng/ml GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) im Medium generiert. Nach erneuter 7tägiger Kultur (Mediumwechsel aller 3 Tage, 37°C, 5% CO₂) wurden die Zellen durch Zugabe von 10ng/ml TNF- α zur finalen Ausreifung angeregt. Zur Untersuchung von eventuellen Gallensäureeeinflüssen, wurden folgende Zellkulturansätze pipettiert:

Kontrolle 1: BMDMs bzw. BMDCs

Kontrolle 2: BMDMs bzw. BMDCs + DMSO

UDCA: BMDMs bzw. BMDCs + 50 μ M UDCA im Medium

*nor*UDCA: BMDMs bzw. BMDCs + 500 μ M *nor*UDCA im Medium.

Zur Applikation der Gallensäuren wurden zunächst Konzentrationsfindungsstudien durchgeführt. Die endgültige Applikationsdosis beider Gallensäuren (UDCA und *nor*UDCA) orientiert sich an den entsprechenden Serumgallensäurespiegeln von therapierten Mäusen und somit an physiologischen Konzentrationen dieser Gallensäuren *in vivo* nach bzw. während der Therapie (Fickert *et al.* 2006).

4.8.2 Durchflusszytometrie

Das Messprinzip der Durchflusszytometrie, auch bezeichnet als FACS (*fluorescence-activated cell sorting*, Becton Dickinson), beruht auf der Detektion Laser-aktivierter Emission von fluoreszierenden, extra- oder intrazellulären Signalen oder anderer mikroskopisch kleiner Partikel. Jede Zelle wird dabei einzeln mittels Unterdruck in einem laminaren Probenstrom am Laser (zumeist Argon-Ionen-Laser) vorbeigeleitet. Wird eine Zelle nun über einen intrazellulären oder auf der Zelloberfläche befindlichen Marker (Antigen) immunhistochemisch mittels eines Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper markiert, kommt es zur Absorption von Lichtenergie in einem für den Farbstoff typischen Wellenbereich. Elektroden gelangen Laser-aktiviert auf ein höheres Energieniveau und emittieren beim Zurückfallen auf das Ausgangsniveau Licht einer bestimmten Wellenlänge. Darüber hinaus werden die Streulichteigenschaften von Zellen durch die Messung der Vorwärtslichtstreuung (*forwardscatter*) und Seitwärtslichtstreuung (*sidescatter*), bestimmt durch die Größe und Granularität von Zellen, ermittelt (Abb. 14).

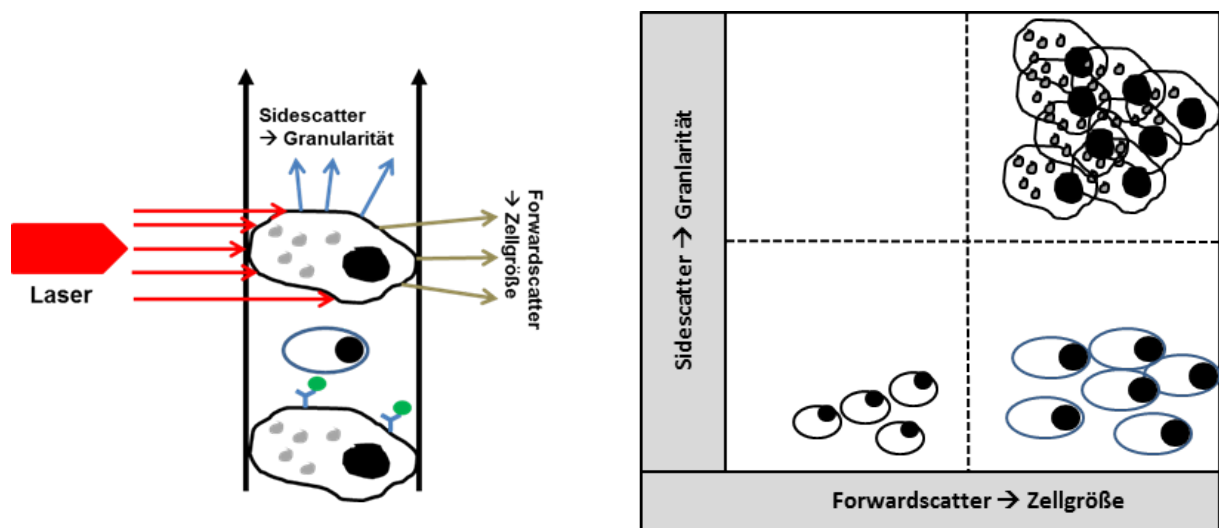


Abbildung 14: Prinzip des Durchflusszytometers

Das vom Laser ausgestrahlte Licht trifft auf eine Zelle mit bestimmten Eigenschaften. Anhand der Streuung der Lichtstrahlen können Aussagen über die Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzmarkierung gemacht werden (modifiziert nach Luttmann *et al.* 2006)

4.8.2.1 Probenvorbereitung und Fluoreszenzmarkierung

Zur Färbung der BMDMs und BMDCs wurden die Zellen zunächst „geerntet“. Hierzu wurde das Medium entfernt und der adhärente Zellrasen mit PBS (*phosphate buffered saline*, PAA, Paschingen, Austria) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Accutase™ (PAA, Paschingen, Austria) vom Flaschenboden gelöst, in Medium zentrifugiert (1300rpm, 7min, 4°C) und anschließend in frischem Medium resuspendiert. Zur FACS-Analyse wird eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml eingesetzt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (1300rpm, 7min, 4°C) und in 90µl FACS-Puffer (Anhang 4.8.2.1) resuspendiert. Unspezifische Bindungen an Fc-Rezeptoren wurden durch einen Inkubationsschritt mit murinem Serum (5min, RT) ausgeschlossen. Anschließend wurde mit dem ersten Antikörper inkubiert (auf Eis, 15min). Wurde eine Probe doppelt oder dreifach gefärbt, so wurden jeweils noch Ansätze für Einzelfärbungen, bzw. ungefärbt mitgeführt. Durch Waschen (Zentrifugation 1300rpm, 7min, 4°C) mit FACS-Puffer wurden ungebundene Antikörper entfernt. Das Zellpellet wurde in 500µl FACS-Puffer resuspendiert und in spezielle FACS-Tubes überführt und gekühlt innerhalb einer Stunde vermessen. Folgende Antikörper kamen hier zur Anwendung:

Tabelle 5: Antikörper für die Durchflussszytometrie

Antikörper	Fluorochrom	Emissions ¹⁾	Hersteller
F4/80	FITC (Fluoresceinisothiocyanat)	519 nm	Abcam, Cambridge, UK (clone BM8)
CD11b	PE (Phycoerythrin)	578 nm	BD, Heidelberg, Germany (clone M1/70)
CD11c	FITC (Fluoresceinisothiocyanat)	519 nm	BD, Heidelberg, Germany (clone HL3)
MHC II (I-Aq)	Alexa 647	640 nm	BioLegend, San Diego, CA (clone KH116)

¹⁾ Bei Anregung mit einem 488 nm Argon-Ionen-Laser

4.8.2.2 Datenanalysen

Am Durchflussszytometer wurde zunächst das „Überstrahlen“ der Fluorochrome (bedingt durch ihr breites Emissionsspektrum), kompensiert. In der *forward-sideward*-Darstellung (Dot-Blot) konnten anschließend mit Hilfe der ungefärbten Kontrolle Schwellenwerte festgelegt werden, damit Zelltrümmer und andere Partikel nicht

erfasst werden. Die Messungen wurden mit einem BD FACSCalibur™ Durchflusszytometer durchgeführt. Analysiert wurden die Daten mit einem angeschlossenen Apple Macintosh-Computer und der Software CellQuest Pro (Version 3.3, BD, Heidelberg, Germany). Zur grafischen Darstellung wurde die Software WinMDI (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry; Version 2.9) von Joe Trotter (Scripps Research Institute, USA) verwendet.

4.9 Isolation von T-helfer Zellen aus murinen, mesenterialen Lymphknoten

Zur Isolation von T-Lymphozyten wurden die mesenterialen Lymphknoten (mLNN) von NMRI-Mäusen verwendet. Die Mäuse wurden hierzu, wie oben beschrieben, mit 50 *S. mansoni* Zerkarien infiziert und 12 Wochen später aufgearbeitet. Die mLNN, dazu gehören *Lnn jejuni*, *Lnn iliaci* und *Lnn colici*, sind Teil des darmassoziierten lymphatischen Gewebes (GALT, *gut associated lymphatic tissue*) und in diesem Stadium der Infektion stark vergrößert. Nach der Entnahme der mLNN wurden diese sofort in eine mit Medium gefüllte Petrischale auf Eis überführt. Mit steriler Schere und Skalpell wurden Fett- und Bindegewebe entfernt. Zum Erstellen einer Einzelzellkultur wurden die mLNN nun mit Hilfe eines Spritzenkolbens vorsichtig über einen Cell Strainer (70µm Poren) in eisgekühltes T-Zell-Medium (Anhang 4.9a) gerieben. Die Zellen wurden anschließend gewaschen (Auffüllen mit T-Zell-Medium und Zentrifugation: 1300rpm, 10min, 4°C) und für 3min zur Erythrozytenlyse mit Erythrozytenlysepuffer (Anhang 4.9b) inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und nach Bestimmung der Zellzahl in MACS-Puffer (Anhang 4.9c) resuspendiert.

4.9.1 Magnetic activated cell sorting (MACS)

4.9.1.1 Positive Selektion von CD4+ T-Zellen

Das gewonnene Zellgemisch aus den mLNN besteht aus Lymphozyten, antigenpräsentierenden Zellen (APC) und Zellen des lymphoretikulären Gewebes. Zur Isolation von CD4⁺ T-Lymphozyten wurde die Methode des *magnetic-activated cell sorting* (MACS) verwendet. Diese Methode beruht auf einer Antikörperbindung an Oberflächenproteine der Zellen. An diese Antikörper sind MicroBeads gebunden, welche über die Antigen/Antikörper-Bindung mit den Zellen einer Suspension verbunden sind. Das Zellgemisch wird nun über eine Säule geleitet, welche von einem starken Magnetfeld umgeben ist. Somit werden die mit MicroBeads gekoppelten Zellen zurückgehalten. Je nach verwendetem Antikörper kann man auf

diese Weise ein Zellgemisch sortieren (Miltenyi *et al.* 1990). Zur Depletion von APCs und B-Lymphozyten wurde zunächst mit einem primären Antikörper, biotinyliertes MHC II, inkubiert und anschließend mit Streptavidin (SA):MicroBeads (Streptavidin:Microbeads, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) markiert. B-Lymphozyten wurden im selben Ansatz mit B220:MicroBeads (CD45R, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) beladen. Nach der automatischen Selektion wurde je ein Aliquot der positiven und negativen Fraktion zur Überprüfung der Selektionsqualität am Durchflusszytometer getestet. Beide Fraktionen wurden hierzu dreifach gefärbt (CD4-FITC, MHC II:Biotin + SA-PE, B220-PeCy5).

4.9.1.2 T-Zell-Aktivierung

Nach der Isolation von CD4⁺ T-Zellen müssen diese restimuliert und somit zur Proliferation angeregt werden. Dies wurde mit dem Dynabeads[®] Mouse CD3/CD28 T Cell Expander (Dynal Hamburg) erreicht. Durch die Bindung von anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern wird die sonst durch APCs eingeleitete T-Zell-Aktivierung nachgeahmt. Der Test wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend in T-Zellmedium kultiviert. Zur Untersuchung von Gallensäureeinflüssen, wurden diese in entsprechenden Ansätzen zum Kulturmedium pipettiert:

Kontrolle 1: T-Zellen ohne anti-CD3/CD8

Kontrolle 2: T-Zellen mit anti-CD3/CD28

UDCA: T-Zellen mit 50µM UDCA im Medium

*nor*UDCA: T-Zellen mit 500µM *nor*UDCA im Medium.

An Tag 6 der Kultur wurde zur Messung der Proliferation ein BrdU-Labeling vorgenommen.

4.9.1.3 Proliferationsmessung

Zur Messung der Proliferation wurde der Einbau des Thymidin-Analogons Bromdesoxyuridin (BrdU) in einem chemilumineszenten ELISA-System genutzt. Über diesen Weg ist es möglich, die DNA-Synthese während des Wachstums einer Zellpopulation zu messen. Während des Übergangs von der S-Phase des Zellzyklus in die G0-Phase wird BrdU in die DNA eingebaut und kann durch eine anschließende Anti-BrdU-Antikörperreaktion quantifiziert werden. In dieser Arbeit kam ein kommerziell erhältliches Testsystem zum Einsatz (Cell Proliferation ELISA, BrdU

chemiluminescent, Roche). Der Test wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Alle Proben wurden ausgewertet als Mittelwerte von Dreifachansätzen \pm Standardabweichung.

4.10 Präparation adulter *Schistosoma mansoni* Würmer

Zur Untersuchung eines möglichen antihelminthischen Effekts der Gallensäuren wurden adulte *S. mansoni* Würmer (Adulte) aus der Pfortader infizierter Mäuse (Infektion mit 300 Zerkarien für zwei Monate) gespült und in Kulturmedium für Adulte unter Zugabe der Gallensäuren kultiviert. Als antihelminthische Positivkontrolle wurde Praziquantel (1 μ g/ml in DMSO) eingesetzt. Die zur Isolation verwendete Perfusionsmethode wurde modifiziert nach Duvall & DeWitt (1967) durchgeführt. Nach Eröffnen des Brustkorbs und der Bauchhöhle wurde zunächst die Pfortader durchtrennt. Anschließend wurde mittels einer Spritze, verbunden mit einer Butterfly-Kanüle, die rechte Herzkammer perfundiert. Als Spüllösung diente eine Natriumchlorid-Lösung mit 10% Heparin. Die Adulten wurden so entgegengesetzt zum Blutstrom aus der durchtrennten Pfortader heraus geschwemmt und in einem Falcon-Röhrchen gesammelt. Zum Entfernen des Blutes wurden die Würmer mit einer vorgewärmten Waschlösung (Anhang 4.10a) gewaschen. Die Adulten wurden nun gleichmäßig in 6 Well-Platten ausgesät. Die anschließende Kultivierung (Anhang 4.10b) erfolgte unter Standardbedingungen im Brutschrank (24h, 37°C, 5% CO₂). Am folgenden Tag wurden die Gallensäuren in verschiedenen Konzentrationen (UDCA und *nor*UDCA jeweils: 50 μ M, 100 μ M; 150 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M und 500 μ M) bzw. Praziquantel (1 μ g/ml) hinzugefügt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Die Auswertung der antihelminthischen Effekte wurde durch mikroskopische Auszählung nach den Kriterien „lebend“ oder „tot“ und „Eiproduktion“ durchgeführt.

4.11 Statistische Analysen

Zur Auswertung der Unterschiede zwischen den entsprechenden Kontrollgruppen wurden folgende statistische Testsysteme herangezogen: Der Student's T-Test wurde zum Vergleich mehrerer Mittelwerte aus Datenreihen mit Normalverteilung verwendet. Dieser Normalverteilung entsprachen die normalisierten Werte der mRNA-Expressionsanalysen, die Auswertung der Blutwerte und die mikroskopischen Auszählungen. Nicht normalverteilte Werte, wie z.B. Hydroxyprolinwerte und Densometrie wurden mittels eines nicht parametrischen Verfahrens (Mann-Whitney

U-Test) ausgewertet. Die statistischen Analysen wurden mit der Statistiksoftware SPSS (Release 14.0, 2005, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

5.1 Versuchsansatz A: Der zeitliche Verlauf der chronischen *S. mansoni* Infektion

5.1.1 Analyse der Infektionsmarker

Die Infektion aller Mäuse resultierte in einer gleichmäßigen Infektion mit *S. mansoni*. Die Anzahl der Ei-Granulome in den Leberschnitten aller infizierten Mäuse war innerhalb der Gruppen einheitlich und vergleichbar (Eier pro Gesichtsfeld: 8 Wo pi $4 \pm 1,5$; 24 Wo *post infectionem*, pi 11 ± 3). Darüber hinaus haben alle Versuchstiere bis zum Ende der Untersuchung überlebt.

Die Antikörper-Werte der infizierten Versuchsgruppen gegen das lösliche Ei-Antigen von *S. mansoni* war etwa 25fach erhöht gegenüber der nicht infizierten Kontrolle (Kontrolle: OD $0,01 \pm 0$; Gruppe 8 Wo pi: OD $5,33 \pm 6,15$). Allerdings wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der Gruppe 8 Wo pi und 24 Wo pi deutlich.

ALT und AST, als Marker für die Schädigung von Hepatozyten, waren in keiner der infizierten Gruppen erhöht gegenüber der Kontrolle (uninfiziert) (Tab. 6). Die alkalische Phosphatase (AP) dient als Marker für eine Cholestase und ist in den infizierten Gruppen gegenüber der Kontrolle erhöht. Einen Unterscheid zwischen den infizierten Gruppen (8 Wo pi und 24 Wo pi) gab es nicht.

Tabelle 6: Leberwerte im zeitlichen Verlauf der *S. mansoni* Infektion

Gruppe				
	Kontrolle (n = 5)	8 Wo pi (n = 5)	24 Wo pi (n = 5)	p-Wert
ALT (U/l)	$189,60 \pm 83,4$	$172,4 \pm 40,1$	$122,9 \pm 60,9$	n.s.
AST (U/l)	427 ± 134	$365,8 \pm 123,0$	$286,4 \pm 59,5$	n.s.
AP (U/l)	$20,3 \pm 3,1$	$31 \pm 9,3$	$37,6 \pm 5$	0,008
Bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	$34,1 \pm 13$	$19,3 \pm 9,5$	$9,3 \pm 2,7$	0,008

Serumbiochemie der Kontrolle und der Gruppen 8 Wo pi und 24 Wo pi nach Infektion mit *S. mansoni*. Die Ergebnisse sind dargestellt als MW \pm SD. ALT, Alanin-Aminotransferase; AST, Aspartat-Aminotransferase. P-Werte sind bezogen auf die Kontrolle vs. 24 Wo pi; n.s. nicht signifikant.

5.1.2 Charakterisierung der Leberfibrose

Um die Deposition von Kollagen über die Zeit quantifizieren zu können, wurden Leberproben der Versuchstiere auf ihren Hydroxyprolinegehalt (HP-Gehalt) untersucht. Die Ergebnisse dieses Versuchsansatzes zeigten, dass eine Infektion mit *S. mansoni* zu einem signifikanten Anstieg des HP-Gehaltes im Vergleich zur

Kontrolle führt (HP $\mu\text{g/g}$ Leber: Kontrolle, 178 ± 13 ; 8 Wo pi, 369 ± 156 ; 24 Wo pi, 798 ± 290). Ein Anstieg des HP-Gehaltes mit voranschreitender Infektion war im Vergleich der beiden infizierten Gruppen (8 und 24 Wo pi) ebenfalls, wenn auch nicht signifikant, erkennbar (Abb. 15A). Diese Ergebnisse spiegeln sich wider in den mRNA Expressionswerten des Kollagens (hier Prokollagen 1a2, Kollagen-1 Fasern). Diese erreichten 5-fache (8 Wo pi) bzw. 4-fache (24 Wo pi) Expressionslevel im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15B).

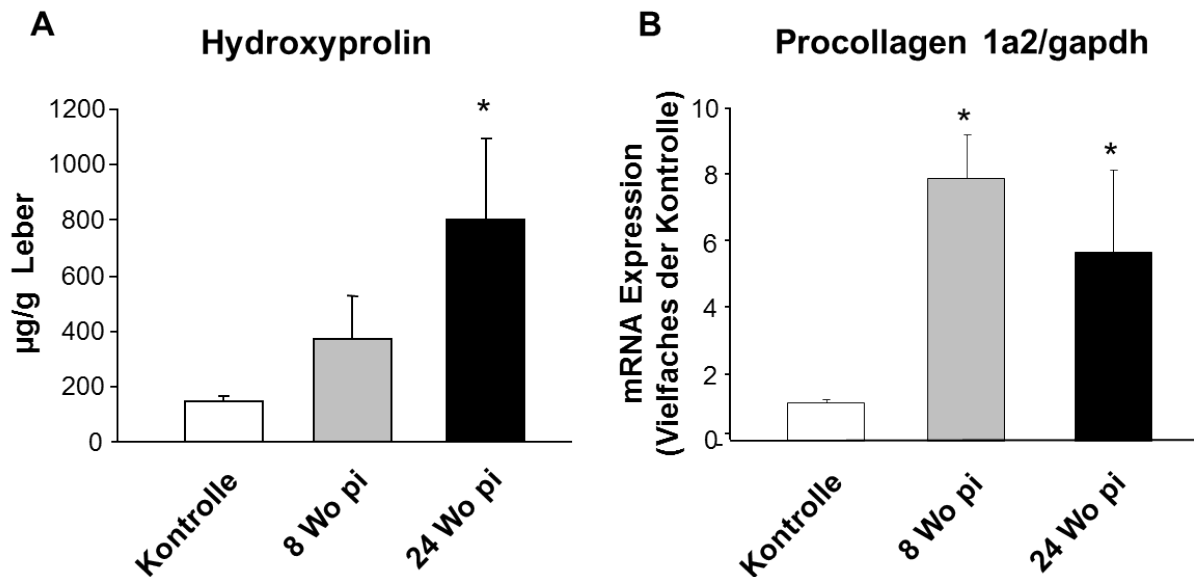


Abbildung 15: Zeitabhängige Entwicklung der hepatischen Fibrose in der *S. mansoni* Infektion. (A) Der Hydroxyprolingehalt wurde in standardisierten Leberstücken gemessen. Dargestellt sind die Werte der Kontrolle ($n=5$) und der infizierten Gruppen 8 und 24 Wo pi ($n=5$). * zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle an ($p<0,05$). (B) Die Gesamt-RNA wurde aus Leberstücken der Kontroll-Tiere ($n=5$) und der 8 und 24 Wochen infizierten Tiere ($n=5$) isoliert. Die mRNA-Expression von Procollagen 1a2 wurde ermittelt durch real-time PCR. Die Daten (normalisierte Mittelwerte zur Expression von Gapdh) sind dargestellt als ein Vielfaches der Kontrolle. * zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle an ($p<0,05$).

Gemeinsam mit dem Expressionsanstieg des Kollagens konnte ein signifikanter Anstieg der Matrix-Metalloproteinase-2 Expression (MMP-2) gemessen werden. Diese war 8 bzw. 24 Wochen nach der Infektion etwa 12-fach erhöht (Abb. 16) Die Expression des Inhibitors TIMP-1 stieg auf das 38-fache (8 Wo pi) und auf das 47-fache (24 Wo pi) an. TGF- β 1 erreichte 8 Wochen nach der Infektion den höchsten Wert und veränderte sich zur 24. Woche nicht, während die iNOS Expression erst in der chronischen Phase der Infektion (24 Wo pi) anstieg (Abb. 17).

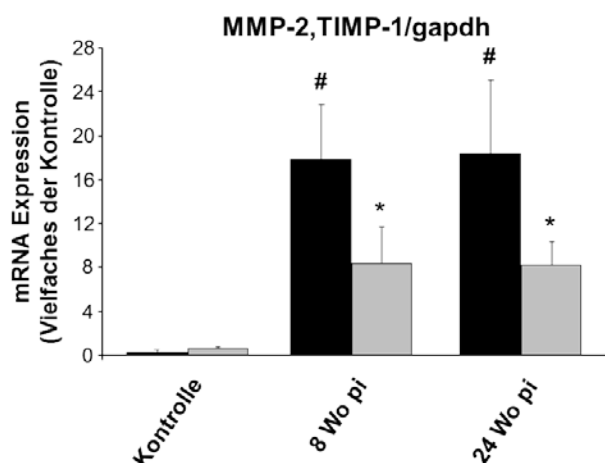


Abbildung 16: Dysbalance der Matrixmetalloproteinase und ihrer Inhibition in der frühen (8 Wo pi) und späten (24 Wo pi) Phase der chronischen *S. mansoni* Infektion. Die Daten (normalisierte Mittelwerte zur Expression von Gapdh) sind dargestellt als ein Vielfaches der Kontrolle. (n=5). [#]TIMP-1 (schwarze Balken, n=5) und ^{*}MMP-2 (graue Balken, n=5) zeigen signifikante Unterschiede zur Kontrolle an (p<0.05).

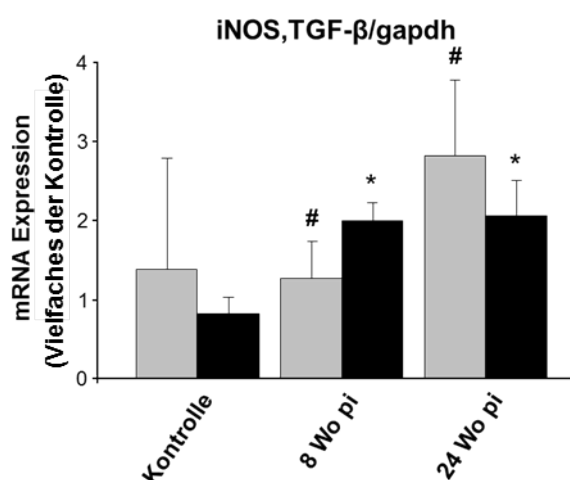


Abbildung 17: Dynamik der Expression von iNOS und TGF-β während der *S. mansoni* Infektion. Die Daten (normalisierte Mittelwerte zur Expression von Gapdh) sind dargestellt als ein Vielfaches der Kontrolle. (n=5). ^{*}TGF-β (schwarze Balken, n=5) und [#]iNOS (graue Balken, n=5) zeigen signifikante Unterschiede zur Kontrolle an (p<0.05).

Die Protein-Analysen zeigten zunächst (8 Wo pi) eine 5-fache Erhöhung des Proteingehaltes im Vergleich zur Kontrolle an (Abb. 18). 24 Wo pi ist der α-SMA-Gehalt tendenziell im Vergleich zur 8 Wo pi Gruppe reduziert.

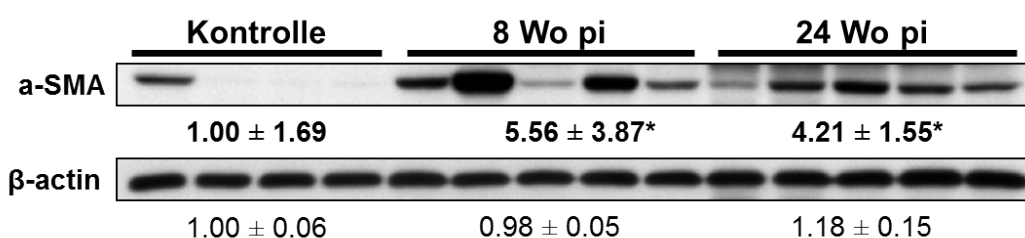


Abbildung 18: α-SMA-Expression in der frühen und späten Phase der chronischen *S. mansoni* Infektion (Westernblot). Der Gesamtproteingehalt wurde isoliert und entsprechend Abschnitt 4.4.3 analysiert. Zur Quantifizierung der Bandenstärke wurden diese densitometriert. Die Daten sind dargestellt als ein Vielfaches der Kontrolle. Die Spezifität der Ergebnisse wurde kontrolliert durch die unveränderten Werte von β-Aktin. * zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle an (p<0.05).

Die Ergebnisse der Proteinanalysen wurden mittels immunhistochemischer Analyse der Leberschnitte verifiziert. Hier zeigte sich eine deutliche Begrenzung der α-SMA

positiven Zellen auf den Bereich der hepatischen Granulome. Das an der Granulombildung nicht beteiligte, umgebende Leberparenchym wies keine Färbung für α -SMA auf. In der Abbildung 19 wird weiterhin deutlich, dass sich die überwiegende Anzahl α -SMA positiver Zellen in hepatischen Granulomen befindet, die ein lebendes Mirazidium beinhalten. Ein Granulom, das eine leere Ei-Hülle umgrenzt, enthält kaum α -SMA positive Zellen.

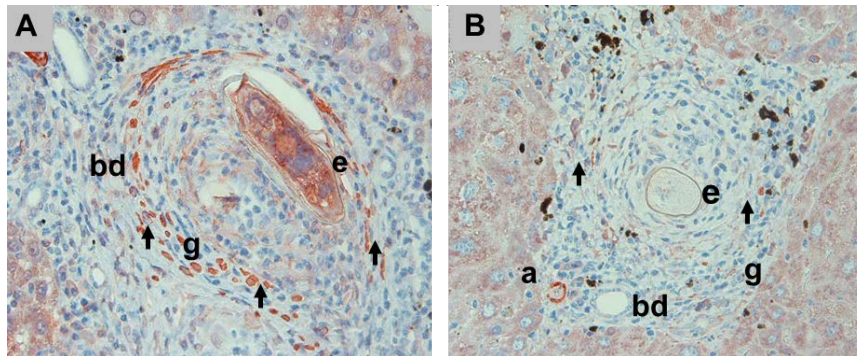


Abbildung 19: α -SMA Expression in der voranschreitenden *S. mansoni* Infektion (Histologie). Die Immunhistochemie wurde durchgeführt wie in Abschnitt 4.4.3 beschrieben. Dargestellt sind repräsentative Leberschnitte von 8 (A) und 24 (B) Wochen infizierten Mäusen. **(A)** Die α -SMA positiven Zellen (Pfeile) sind überwiegend auf den Bereich der Granulome beschränkt, die ein lebendes Mirazidium beinhalten (400fach). **(B)** In Granulomen mit leerer Ei-Hülle sinkt die Anzahl der α -SMA positiven Zellen (Pfeile) (400fach). e, Ei; bd, Gallengang; g, Granulom.

5.1.3 Umbau der Gallengänge

Die histologische Auswertung von Leberschnitten aller Versuchstiere (n=5 pro Gruppe: Kontrolle, 8 Wo pi und 24 Wo pi) ergab: 8 Wo pi waren die Parasiten-Eier in den feinen Ausläufern der Portalvenen „gefangen“, dicht umhüllt von entzündlichem Zellinfiltrat mit einem Hauptanteil an eosinophilen Granulozyten und Bindegewebe. Hämozoin-Pigment war sowohl in den Portalfeldern als auch in parenchymatischen Grenzbereichen abgelagert. Kreisförmige fibrotische Narben nahmen große Flächen der Portalfelder ein (Abb. 20a). 24 Wo pi war die Fibrose deutlich vorangeschritten mit zum Teil deutlichen Anzeichen porto-portaler Verknüpfung (Abb. 20b). Die Fibrose ist hier über die Grenzen der vorhandenen Portalfelder ausgebreitet.

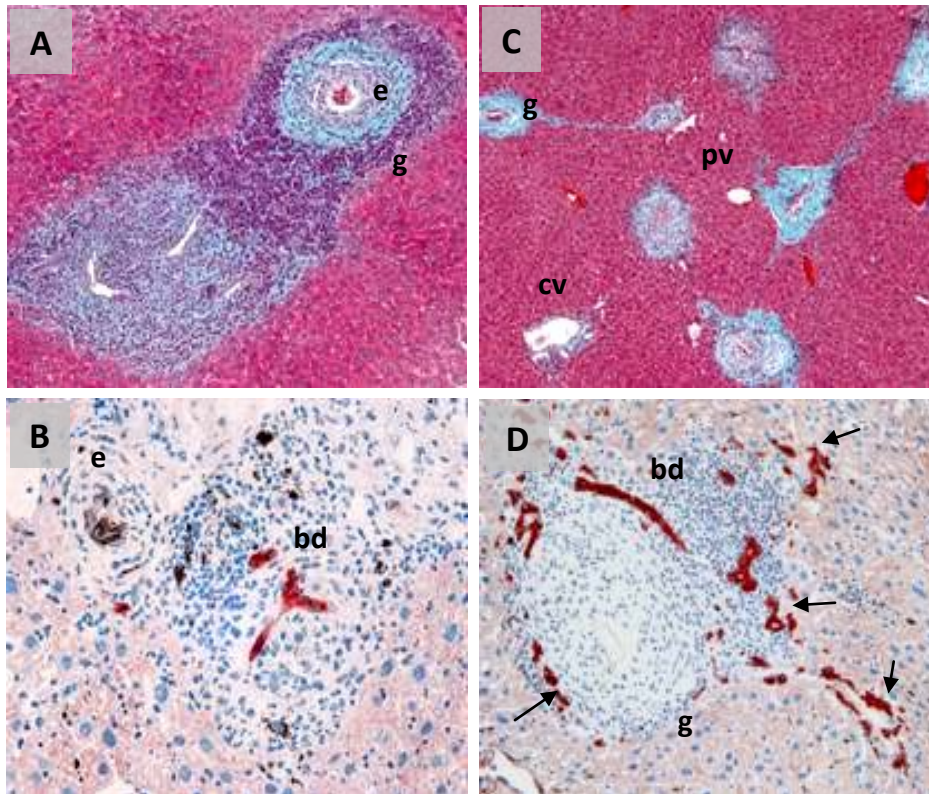


Abbildung 20: Der Zusammenhang zwischen hepatischer Fibrose und duktulärer Proliferation in Leberschnitten *S. mansoni* infizierter Mäuse. Dargestellt sind repräsentative Leberschnitte 8 (A und C) bzw. 24 (B und D) Wochen nach Infektion. **(A)** 8 Wo pi sind *S. mansoni* Eier umgeben von entzündlichem Zellinfiltrat, eingebettet in fibrotischem Narbengewebe (Goldner Färbung, 200fach). **(B)** 24 Wo pi bilden sich zunehmend fibrotische Septen mit zum Teil porto-portaler Verknüpfung (Goldner Färbung, 100fach). **(C)** Immunhistochemische Färbungen für Keratin 19 (K19, Pfeil) zeigt 8 Wo pi eine Gallengangsproliferation verbunden mit einer Stauchung der Gallengänge und duktulärer Verzweigung an (K19-ICH, 400fach). **(D)** 24 Wo pi zeigt sich eine deutliche Veränderung der existierenden, interlobulären Gallengänge, eine Verdrängung dieser ins Leberparenchym und eine deutliche duktuläre Proliferation (K19-ICH, 200fach). e, Ei; bd, Gallengang, pv, Pfortader; cv, Zentralvene.

Keratin 19 (K19) als Marker für unreife, kleinere Gallengänge (Gallengangsproliferation) wurde sowohl immunhistochemisch in Leberschnitten, als auch im Western-Blot analysiert. 8 Wo pi zeigte sich eine deutliche Veränderung der ursprünglichen Gallengangsarchitektur. Das histologische Bild zeigt eine duktuläre Verästelung und Gallengangsproliferation/Gallengangsneubildung durch K19 positive Zellen an. Dieser Effekt wurde durch eine längere Infektionszeit (24 Wo pi) noch verstärkt (Abb. 20C und 20D). Anzeichen für den Verlust intrahepatischer Gallengänge (Duktopenie) konnten nicht ausgemacht werden. Die Ergebnisse der Proteinanalysen zur Quantifizierung von K19 entsprachen den histologischen Beobachtungen. Leberproben von 8 und 24 Wochen infizierten Mäusen enthielten signifikant höhere Mengen K19 als die Tiere der Kontrollgruppe (Abb. 21).

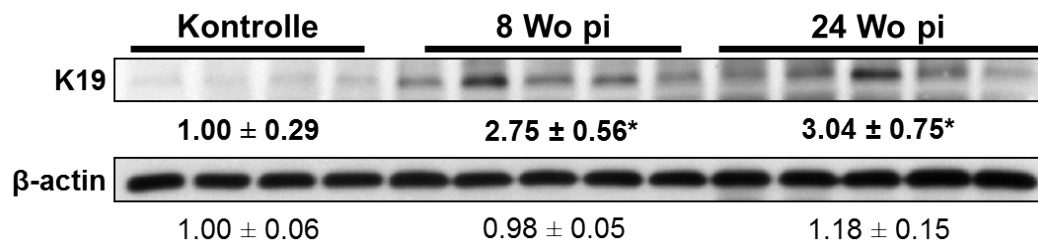


Abbildung 21: Westernblot-Analyse der Keratin 19 (K19) Expression im Verlauf der chronischen *S. mansoni* Infektion Das Expressionsmuster von K19 zeigt eine signifikante Erhöhung nach der Infektion mit *S. mansoni*. Die densitometrischen Daten sind dargestellt als ein Vielfaches der Kontrolle. Die Spezifität der Ergebnisse wurde kontrolliert durch die unveränderten Werte von β-Aktin. * zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle an ($p < 0.05$).

Zur weiteren Charakterisierung der Gallengangsalteration wurden Leberschnitte immunhistochemisch gegen VCAM-1 gefärbt. VCAM-1 diente hier als Marker für den „reaktiven“ Phänotyp von Cholangiozyten (Fickert *et al.* 2006).

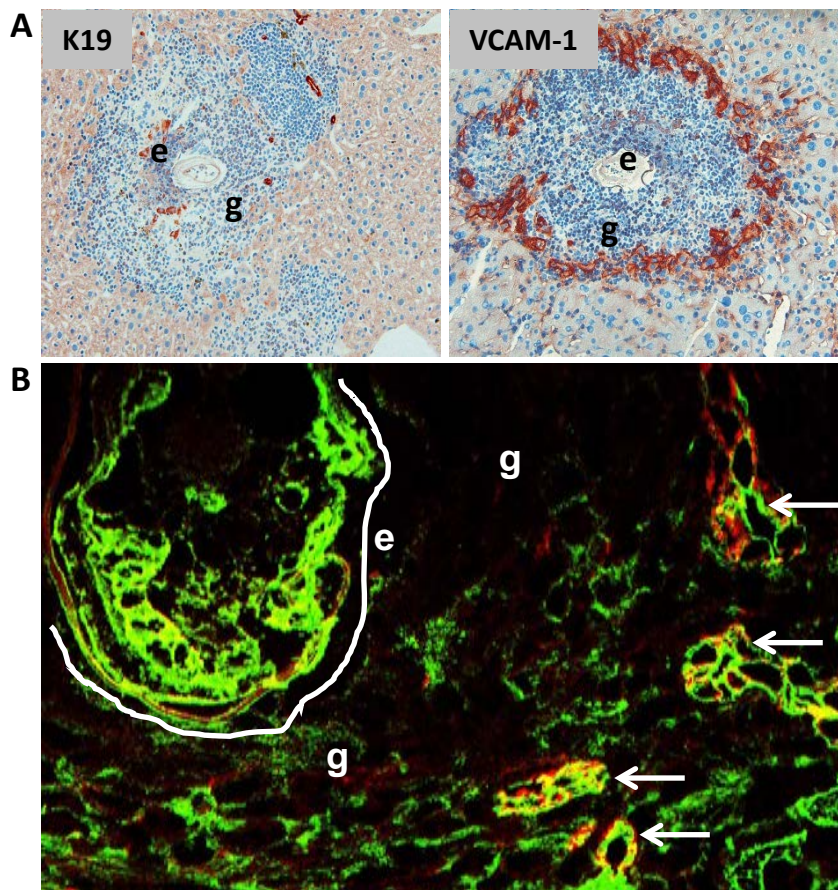


Abbildung 22: VCAM-1 und K19 Expression in *S. mansoni* Ei-Granulomen. (A) Leberhistologie und immunhistochemische Färbungen in Serienschnitten von 8 Wochen infizierten Mäusen K19 (dargestellt durch vertikale Pfeile ↑) und VCAM-1 (dargestellt durch horizontale Pfeile →) positive Zellen im Bereich der Leberläppchen, ein Anzeichen für den reaktiven Phänotyp von Hepatozyten, die das Granulom umgeben. (B) Fluoreszenzfärbung gegen K19 und K8 zur Identifizierung der VCAM-1 positiven Zellen. VCAM-1 positive Zellen im Grenzbereich zum hepatischen Granulom waren K8 positiv. e, Ei; cv, Zentralvene.

Histologisch waren VCAM-1 positive Zellen sowohl im Bereich der Gallengänge zu finden, als auch im äußeren Rand der Lebergranulome (Abb. 22A). Serienschnitte (VCAM-1/K19/K8) der infizierten Lebern zeigten VCAM-1/K8 doppelt positive Zellen am äußeren Granulomrand. Diese doppelt positiven Zellen waren negativ für den Gallengangsmarker K19 (Abb. 22B).

Die Proteinanalyse von VCAM-1 zeigte eine signifikante Erhöhung in beiden infizierten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle an, wobei ein tendenzieller Abfall der VCAM-1 Expression in der Gruppe 24 Wo pi zu messen war (Abb. 23).

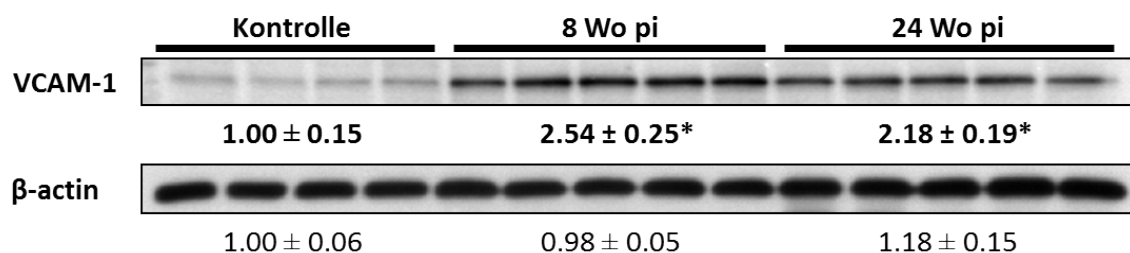


Abbildung 23: Westernblot-Analyse zur VCAM-1 Expression in Lebern *S. mansoni* infizierter Mäuse 8 und 24 Wo pi Protein-Analysen in Leber Homogenaten zeigen eine deutliche Erhöhung der VCAM-1 Expression an. Ein signifikanter Unterschied zwischen 8 und 24 Wo pi existiert nicht. * zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle an ($p < 0.05$). Die densometrischen Daten sind dargestellt als ein Vielfaches der Kontrolle. Die Spezifität der Ergebnisse wurde durch die gleichbleibenden Werte von β -Aktin verifiziert.

5.2 Versuchsteil B: Die Rolle des Farnesoid X Rezeptors in der granulomatösen Leberfibrose der *Schistosoma mansoni* Infektion

5.2.1 Analyse der Infektionsmarker

Die Analyse der Leberwerte ergab deutliche Anzeichen für eine Leberzellschädigung in den FXR^{-/-} Tieren mit und ohne Infektion, angezeigt durch signifikant erhöhte Werte von AST und ALT. Auch sind die Marker einer Lebercholestase von FXR^{-/-} Mäusen signifikant erhöht gegenüber den Wildtyp Mäusen (Tab. 7). Eine Infektion mit *S. mansoni* veränderte dieses Bild nicht. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen FXR^{+/+} infiziert und uninfiziert bzw. FXR^{-/-} infiziert und uninfiziert.

Tabelle 7: Leber Serumbiochemie: FXR+/+ versus FXR-/- während der *S. mansoni* Infektion.

Gruppe					
	FXR+/+ Kontrolle (n=5)	FXR+/+ Infiziert (n=5)	FXR-/- Kontrolle (n=5)	FXR-/- Infiziert (n=5)	* vs. FXR+/+ Kontrolle # vs. FXR+/+ infiziert ‡ vs. FXR-/- Kontrolle
ALT (U/l)	138 ± 66	279 ± 82,3*	269 ± 98*	272 ± 132*	
AST (U/l)	726 ± 350	647 ± 203	1505 ± 394*	862 ± 309 ^{#‡}	
AP (U/l)	64 ± 11	55 ± 12*	124 ± 60 [#]	109 ± 52 [#]	
T-Bilirubin (mg/dl)	0,24 ± 0,07	0,2 ± 0,03	0,34 ± 0,1 ^{*#}	0,45 ± 0,22 ^{*#}	
BA (µmol/l)	42 ± 11,3	51 ± 9,4	95 ± 43*	102 ± 78	

Daten sind dargestellt als MW ± SD. FXR+/+ Kontrolle: uninfiziert, FXR Wildtyp; FXR +/+ infiziert: infiziert, FXR Wildtyp; FXR-/- Kontrolle: uninfiziert, FXR knock out; FXR-/- infiziert: infiziert, FXR knock out. *, # und ‡ zeigen signifikante Unterschiede an ($p < 0.05$).

5.2.2 Charakterisierung der Leberfibrose

Histologische Schnitte der Lebern aller Versuchstiere wurden angefertigt, um die hepatische Fibrose beurteilen zu können. Deutlich wird hier, dass es histologisch keinen Unterschied zwischen infizierten FXR +/+ und infizierten FXR -/- Mäusen gibt (Abb. 24A). Sehr deutlich spiegelt sich das histologische Bild im HP-Gehalt wider. Nach der Infektion stiegen die HP-Werte stark an (HP µg/g Leber; Kontrolle FXR +/+ : 195±12; Kontrolle FXR -/- : 195±46 und Infektion FXR +/+ : 570±290; Infektion FXR -/- : 478±117) (Abb. 24B).

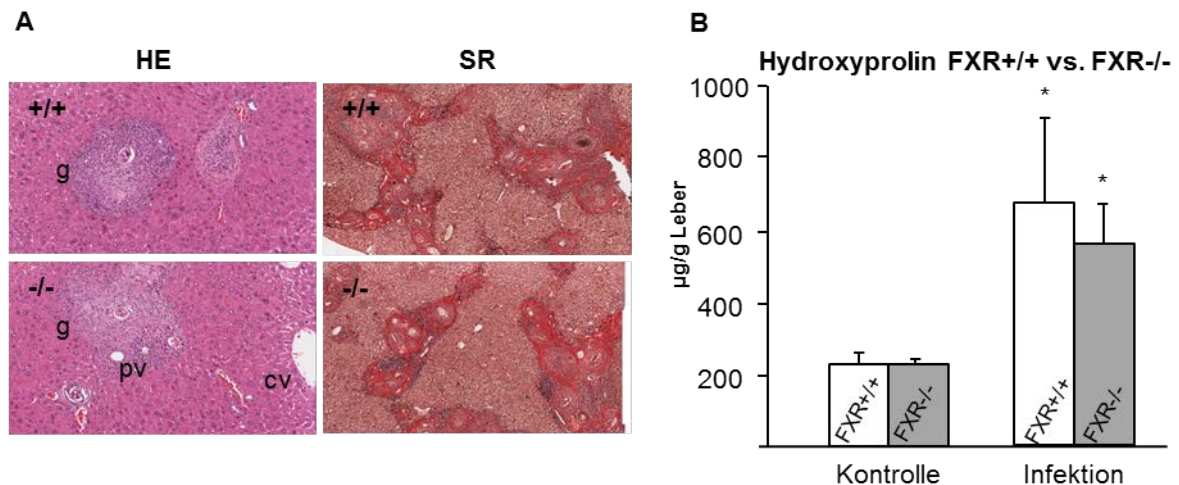


Abbildung 24: Die Depletion von FXR hat keinen Einfluss auf den Grad der Fibrose in *S. mansoni* infizierten Mäusen. (A) Dargestellt sind histologische Schnitte (Hämatoxylin/Eosin Färbung x80, Sirius Red x20) von 8 Wochen infizierten *S. mansoni* Mäusen mit (Wildtyp +/+) und ohne FXR (knock out -/-). **(B)** Der Hydroxyprolingehalt wurde in standardisierten Leberstücken gemessen. Dargestellt sind die Werte der Kontrolle (FXR +/+ und -/-; n=5) und der infizierten Gruppen (FXR +/+ und -/-; n=5). Die Quantifizierung der Fibrose zeigt eine vergleichbare Erhöhung des Hydroxyprolins in beiden Genotypen. Ein Unterschied im Hydroxyprolingehalt der Lebern ist nur zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren zu finden. *zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle an ($p < 0,05$).

Zur weiteren Untersuchung der Fibrose auf molekularer Ebene diente die mRNA-Expressionsanalyse von Kollagen (procol 1a2) und Shp (*small heterodimer protein*). Die Kollagenproduktion unterscheidet sich nicht zwischen den beiden untersuchten Genotypen. Die Expressionslevel von Shp waren am höchsten in den uninfizierten Wildtyp-Mäusen und leicht reduziert nach Infektion. In den Knockout-Mäusen war Shp signifikant reduziert sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Tieren.

5.3 Versuchsteil C: Gallensäuretherapie

5.3.1 Analyse der Infektionsmarker

Die Infektion mit *S. mansoni* führte in diesem Versuchsansatz verbunden mit der Gabe von Gallensäuren zum Verlust einiger Versuchstiere (Kontrolle 1 von 6; UDCA 2 von 6; *nor*UDCA 0 von 6).

Die mikroskopische Auszählung von Eigranulomen in den Leberschnitten aller Versuchstiere ergab eine einheitliche und vergleichbare Infektionslast (Anzahl der Eigranulome in 30 Gesichtsfeldern pro Leberschnitt; Kontrolle: 143 ± 34 ; UDCA: 127 ± 18 und *nor*UDCA: 124 ± 25). Signifikante Veränderungen zwischen den Leberwerten im Serum von naiven und infizierten Mäusen waren nicht vorhanden (Tab. 8).

Darüber hinaus ergab die morphometrische Analyse von 30 Eigranulomen (Abb. 25) in einem Leberschnitt pro Maus eine Reduktion der Granulomgröße von durchschnittlich 33% in den *nor*UDCA behandelten Mäusen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Granulomgröße in % der Kontrolle; UDCA: 100 ± 6 , n. s und *nor*UDCA: 67 ± 12 , $p < 0,001$).

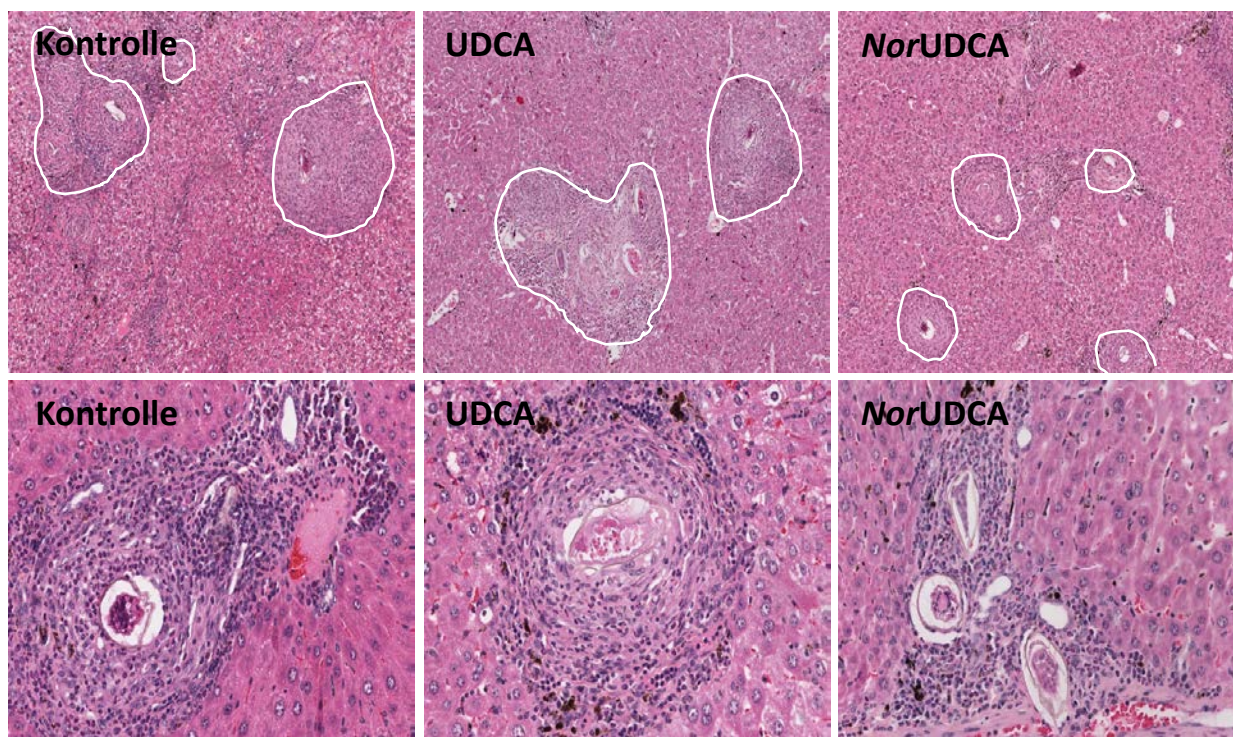


Abbildung 25: *NorUDCA* reduziert die Granulomgröße infizierter *S. mansoni* Mäuse im chronischen Krankheitsstadium. Dargestellt sind repräsentative Leberhistologien (Hämatoxylin/Eosin Färbung, H&E) weiblicher NMRI-Mäuse 16 Wochen nach der Infektion mit 50 *S. mansoni* Zerkarien (Kontrolle), mit UDCA (0.5% wt/wt) oder *norUDCA* (0.5% wt/wt) als Futterzusatz für 4 Wochen. Eine 4-wöchige *norUDCA*-Gabe führte zu einer signifikant reduzierten Granulomgröße im Vergleich zur Kontrolle und der UDCA-Gruppe (obere Reihe: umrandete *S. mansoni* Eigranulome; obere Reihe: 100fache Vergrößerung und untere Reihe: 400fache Vergrößerung).

Tabelle 8: Leber Serumbiochemie in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen

Variable	Naive (n=6)	Kontrolle (n=5)	UDCA (n=4)	<i>NorUDCA</i> (n=6)	
ALT (U/L)	189±100	105±29	158±53	155±93	*versus naive
AP (U/L)	84±7	42±4*	61±27	60±36	
Gallensäuren (µmol/L)	30±8	47±7	62±3	381±39*	

Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung. Naive: unbehandelte, uninfizierte Mäuse; Kontrolle: unbehandelte, infizierte Mäuse; UDCA: infizierte, UDCA-behandelte Mäuse; *NorUDCA*: infizierte, *norUDCA*-behandelte Mäuse. * $p < 0,05$.

5.3.2 Weder UDCA noch *norUDCA* zeigen *in vitro* antihelminthische Effekte

Um mögliche antihelminthische Effekte der beiden getesteten Gallensäuren ausschließen zu können, wurden *in vitro* Untersuchungen mit isolierten, adulten *S. mansoni* Wurmpaaren durchgeführt (Abb. 26). Als antihelminthische Positivkontrolle

diente hier Praziquantel. Alle isolierten Würmer waren innerhalb von 6 Stunden nach der Behandlung mit Praziquantel tot. Die Aufzeichnungen der UDCA- und *nor*UDCA-behandelten Würmer zeigten in keiner der verwendeten Gallensäurekonzentrationen eine antihelminthische Wirkung. Auch 5 Tage nach Beginn der Inkubation konnten keine Vitalitätsverluste bei den adulten Würmern gemessen werden (nach 5 Tagen Inkubation: Praziquantel 0%; Kontrolle 95,8%; UDCA 93,3%; *nor*UDCA 95,5% vitale Würmer). Zusätzlich wurden die *in vitro* produzierten Eier mikroskopisch ausgezählt. Es konnten toxische Effekte anhand der Anzahl der in Kultur produzierten Eier unter Gallensäureeinfluss im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden (Anzahl der Parasiten-Eier am Tag 5 der Gallensäureinkubation: Kontrolle 912; 500µM UDCA 963; 500µM *nor*UDCA 1226).

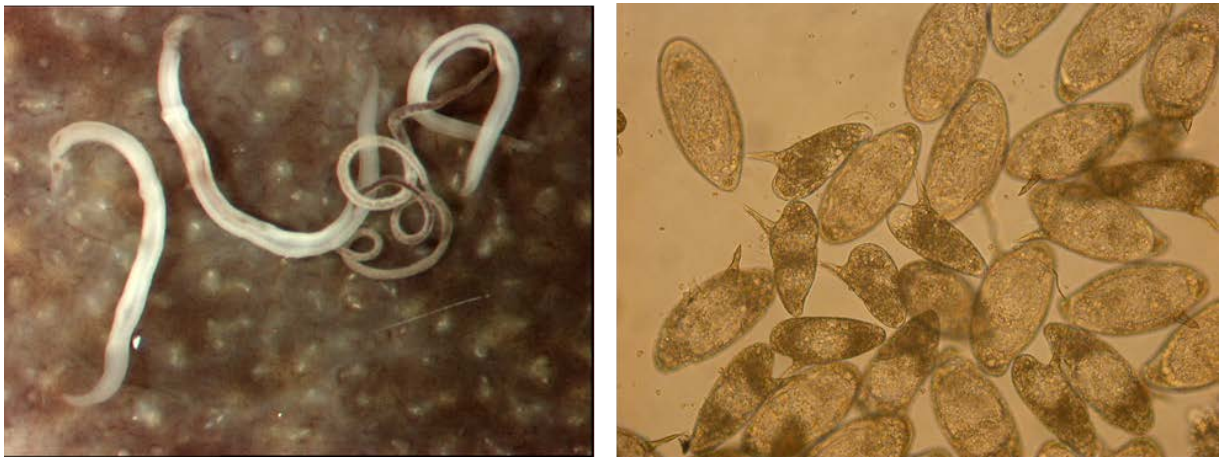


Abbildung 26: Kultur adulter *S. mansoni* Würmer (links, 50fach) und *S. mansoni* Eier (rechts, 400fach). (Quelle: Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsklinik Rostock)

5.3.3 *Nor*UDCA hemmt die Entzündungsreaktion und die Granulomformation

Das Ausmaß der Entzündung in Mauslebern unter den gegebenen experimentellen Voraussetzungen wurde mittels RT-PCR analysiert. Die folgende Tabelle macht deutlich, dass eine Infektion mit *S. mansoni* zu einem deutlichen Anstieg der Expression der proinflammatorischen und profibrotischen Gene führt. Im Vergleich zur Kontrolle zeigt sich, dass UDCA und *nor*UDCA auf Entzündungsebene gleichermaßen entzündungshemmende Effekte haben. Beide Gallensäuren reduzieren die Expressionslevel von IL-1 β , IFN- γ , iNOS und TNF- α (Tab. 9).

Tabelle 9: Die mRNA Expressionsprofile unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen (SYBR Green Analyse)

Gruppe	Naive (n=6)	Kontrolle (n=5)	UDCA (n=4)	NorUDCA (n=6)
IL-1 β	100 \pm 29	223 \pm 80*	120 \pm 96	81 \pm 21 [#]
IFN- γ	100 \pm 46	360 \pm 90*	200 \pm 200	230 \pm 50 ^{*#}
iNOS	100 \pm 36	1008 \pm 405*	418 \pm 122 ^{*#}	539 \pm 79 ^{*#}
TNF- α	100 \pm 42	385 \pm 160*	123 \pm 28 [#]	210 \pm 49 ^{*#†}
TGF- β 1	100 \pm 13	164 \pm 42*	129 \pm 15*	117 \pm 12 ^{*#}
procol1a2	100 \pm 21	381 \pm 121*	210 \pm 52 ^{*#}	262 \pm 72*

Die Daten sind dargestellt als Prozent der naiven Mäuse; MW \pm SD. Naive: unbehandelte, uninfizierte Mäuse; Kontrolle: unbehandelte, infizierte Mäuse; UDCA: infizierte, UDCA-behandelte Mäuse; NorUDCA: infizierte, norUDCA-behandelte Mäuse. IL-1 β : Interleukin-1 β ; IFN- γ : Interferon-gamma; iNOS: *inducible nitric oxide synthase*; TNF- α : *tumor necrosis factor- α* ; TGF- β 1: *transforming growth factor- β 1*. $p < 0.05$ (*vs. Naive; [#]vs. Kontrolle; [†]vs. UDCA).

Die immunhistochemische Analyse von Antikörpern gegen CD4 (Th-Zellen) und CD11b (Monozyten/Makrophagen und Granulozyten) auf Leberschnitten zeigte eine umfangreiche Ansammlung von Entzündungszellen in den Eigranulomen der infizierten Tiere. Dennoch war ein deutlicher Unterschied im Aufbau der Granulome in den 3 infizierten Versuchsgruppen (Kontrolle, UDCA, *norUDCA*) zu erkennen. Die Granulome in der *norUDCA* Gruppe waren nicht nur im Durchmesser kleiner (33% im Vergleich zur Kontrolle). Auch die Anzahl der Entzündungszellen im Granulom war wesentlich geringer (Abb. 27). Die Zellen im Granulom erschienen deutlich lockerer angeordnet im Vergleich zu den Granulomen der Kontrollgruppe. Die durchschnittliche Fläche der Granulome der UDCA-Gruppe war vergleichbar mit der der Kontrolle. Aber auch hier wird der deutlich losere Verband der Entzündungszellen, vor allem der CD11b⁺ Granulozyten, deutlich.

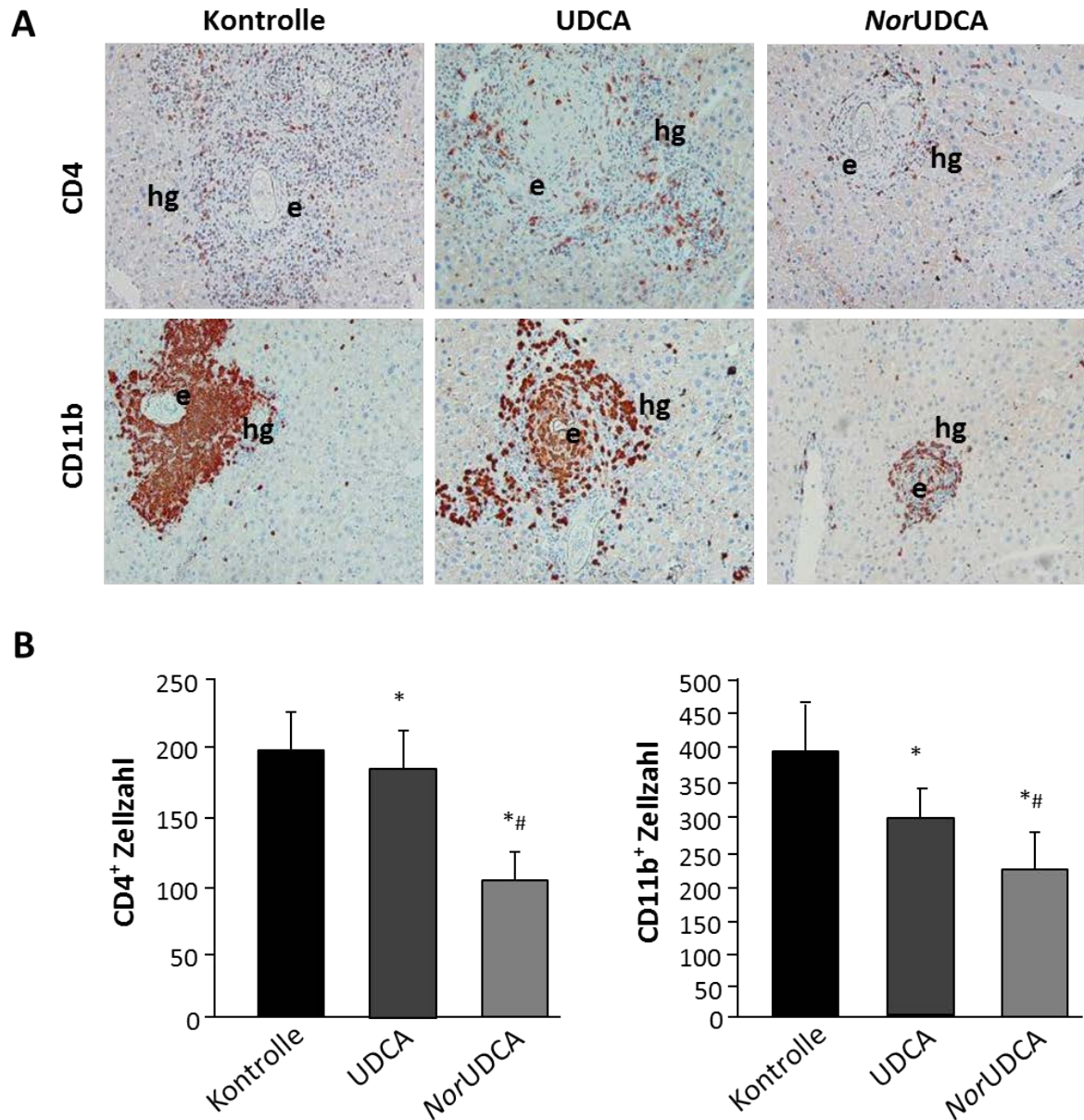


Abbildung 27: NorUDCA hemmt die Einwanderung von Entzündungszellen und die Granulomformation in Lebern *S. mansoni* infizierter Mäuse. (A) Dargestellt ist eine repräsentative Immunhistochemie für CD4 und CD11b von Leberproben der Versuchsgruppen (naive, n=6; Kontrolle, n=5, UDCA, n=4; norUDCA, n=6). Die norUDCA-Behandlung führt zu einer deutlichen Reduktion von CD4⁺ T-Lymphozyten und CD11b⁺ Monozyten (Makrophagen)/Granulozyten. (B) Die Anzahl der CD4⁺ Lymphozyten und CD11b⁺ Monozyten/Granulozyten wurde in 20 Gesichtsfeldern pro Tier ermittelt und ist dargestellt als MW ± SD. CD4⁺ und CD11b⁺ Zellen sind signifikant reduziert in der norUDCA Gruppe verglichen mit der Kontrolle und UDCA (Vergrößerung 20x). e, Ei; hg, hepatisches Granulom. **p*<0.05 (vs. Kontrolle), #*p*<0.05 (vs. UDCA).

5.3.4 NorUDCA reduziert die hepatische Fibrose

Sirius Red (Kollagen-Färbung) gefärbte Leberschnitte zeigten einen hohen Gehalt an Bindegewebe in den Eigranulomen und deutliche fibrotische Septen zwischen den Portalfeldern (Abb. 28). Dieses porto-portale „bridging“ ist am stärksten ausgeprägt in den Lebern der Kontrolltiere und der UDCA-Gruppe. Die Granulome in der

norUDCA-Gruppe treten ebenfalls deutlich hervor, doch waren hier keine Verknüpfungen der Portalfelder durch fibrotische Septen ausgebildet.

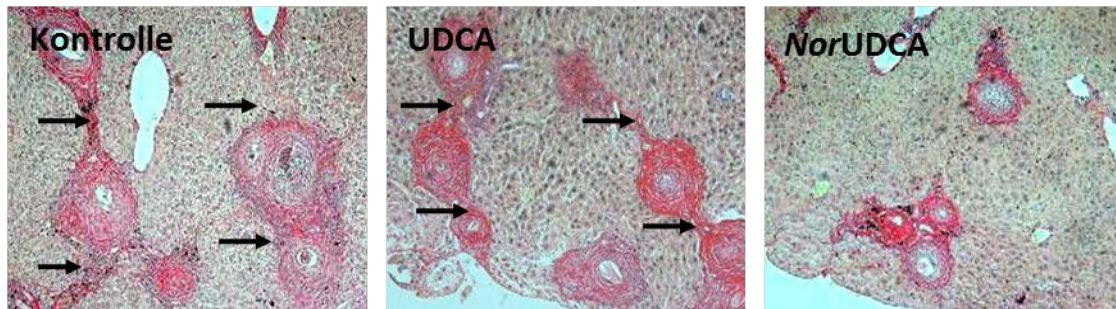


Abbildung 28: *NorUDCA* reduziert die Bildung fibrotischer Septen in den Lebern *S. mansoni* infizierter Mäuse. Die Sirius Red (SR) Färbung von Leberproben infizierter Mäuse mit zum einen Kontrollfutter und zum anderen Gallensäurefutterzusatz (UDCA, 0.5% wt/wt und *norUDCA*, 0.5% wt/wt) zeigen eine starke Einlagerung von Bindegewebe in den Eigranulomen der Leber und eine starke porto-portale Verknüpfung durch fibrotische Septen in der Kontroll- und UDCA-Gruppe. Diese ist nach *norUDCA*-Therapie deutlich reduziert (Vergrößerung, 400x).

Das Scoring der hepatischen Fibrose der infizierten Versuchsgruppen (Fibrose-Score Kapitel 4.4.1) ergab eine signifikante Reduktion der Leberfibrose der *norUDCA*-behandelten Mäuse gegenüber der Kontroll- und der UDCA-Gruppe. Beide Gruppen zeigten vergleichbare Fibrosegrade (Kontrolle: $4,4 \pm 0,5$; UDCA: $4,3 \pm 1$; *norUDCA*: $2,5 \pm 0,5$). Dies spiegelte sich auch in den HP-Werten der Lebern wider. Die höchsten Werte erreichten hier die Tiere der Kontrollgruppe. Die UDCA-behandelten Tiere hatten ebenfalls signifikant erhöhte HP-Werte. Nur nach *norUDCA*-Fütterung konnte eine Reduktion der HP-Werte erreicht werden, die keinen signifikanten Unterschied mehr zu den naiven, uninfizierten Tieren zeigte (Abb. 29).

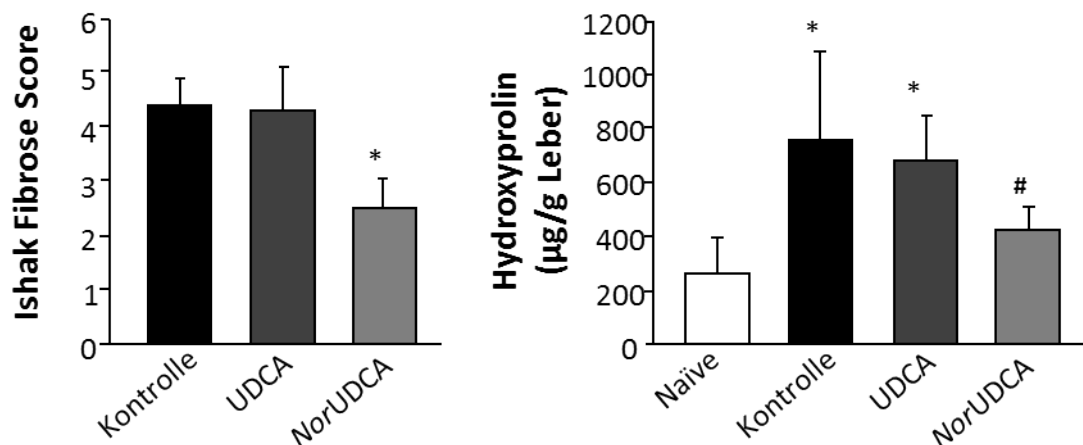


Abbildung 29: Die Quantifizierung der Leberfibrose in *S. mansoni* infizierten Mäusen nach Gallensäuretherapie. Die Leberhistologien wurden über ein semi-quantitatives Fibrose-Score-System analysiert (Ishak *et. al.* 1999, F0-F6). *NorUDCA* verbessert die hepatische Fibrose um 2 Stufen. * $p < 0,05$ (vs. Kontrolle). Zur Quantifizierung der hepatischen Fibrose wurden die Hydroxyprolinwerte in allen Leberproben ermittelt. Nach der Infektion sind die Hydroxyprolinwerte in allen Gruppen erhöht. Diese Erhöhung erreicht aber nur in der Kontrolle und der UDCA-Gruppe signifikante Werte. * $p < 0,05$ (vs. naive), # $p < 0,05$ (vs. Kontrolle).

Die Messung des profibrotischen Interleukins (IL) IL-13 ergab eine signifikante Reduktion dieses Th2-Zytokins im Serum der *norUDCA*-Tiere im Vergleich zur Kontrolle und der UDCA-Gruppe, welche vergleichbar hohe Werte erreichten (Abb. 30).

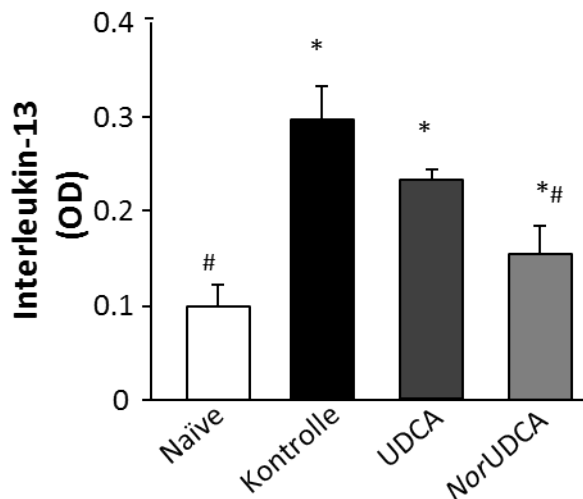


Abbildung 30: IL-13 Expression in Serumproben *S. mansoni* infizierter Mäuse mit und ohne Gallensäuretherapie. Die Expression von Interleukin 13 wurde über einen Maus-spezifischen IL-13 ELISA gemessen. Die 4-wöchige Therapie mit *norUDCA* führte zu einer signifikanten Reduktion des IL-13 Gehalts im Serum verglichen mit der Kontrolle und der UDCA-Gruppe. * $p < 0.05$ (vs. naive), # $p < 0.05$ (vs. Kontrolle).

Der Abbau extrazellulärer Matrix und dessen Hemmung wurden über die Messung der mRNA-Expression von MMP-2 und TIMP-1 ermittelt. Die Expressionslevel beider Gene waren, wie auch im Versuchsansatz A, deutlich erhöht im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Vielfaches der Naive Gruppe; Kontrolle und MMP-2: 7,5-fach und TIMP-1: 33-fach). Stellt man den Abbau des Bindegewebes über die Expressionswerte von MMP-2 ins Verhältnis zur Hemmung des Abbaus über die Expressionswerte von TIMP-1, kann man diese Expressionsdaten weiter interpretieren (Singh *et al.* 2004). Vergleichsweise hohe Werte dieser Ratio mit einer dominierenden TIMP-1 Aktivität sprechen für eine starke Deposition von Bindegewebe. Niedrigere Werte weisen auf einen stärkeren MMP-2-Einfluss hin. In diesem Versuch lag die MMP-2/TIMP-1 Ratio der *norUDCA*-Tiere signifikant unter den Werten der Vergleichsgruppen (Ratio MMP-2/TIMP-1: Kontrolle 3,1; UDCA 2,6; *norUDCA* 2,1).

5.3.5 *NorUDCA* beeinflusst die Oberflächenexpression des Haupthistokompatibilitätskomplexes (Klasse II, MHC II) auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) und die Proliferation aktivierter CD4⁺ T-Lymphozyten

5.3.5.1 *NorUDCA* hemmt die MHC II Expression auf Makrophagen und Dendritischen Zellen

Zur Klärung des Einflusses der zu testenden Gallensäuren auf die Antigenpräsentation wurden Makrophagen (*bone marrow derived macrophages*, BMDM) und Dendritische Zellen (*bone marrow derived dendritic cells*, BMDC) in vitro mit UDCA und *nor*UDCA inkubiert und anschließend auf ihre MHC II Expression untersucht. Etwa 90% aller mit M-CSF inkubierten hämatopoetischen Stammzellen entwickelten sich zu F4/80⁺ Zellen. Diese Zellen wurden neben diesem Makrophagen-spezifischen Marker auch durch die morphologische Charakterisierung am Mikroskop als Makrophagen (BMDM) identifiziert. Die Zellen zeigten die typischen, langen Zellausläufer und einen prominenten Zellkern (Abb. 31A). In konfluentem Zustand bildeten die Zellen einen pflastersteinartigen Zellrasen. 49% der mit GM-CSF inkubierten hämatopoetischen Zellen entwickelten sich zu CD11c⁺ Zellen, welche mikroskopisch einen auffällig kompakten, polygonalen Zellkörper mit pseudopodienartigen Zellausläufern (Abb. 31B) zeigen und somit als Dendritische Zellen (BMDC) charakterisiert werden konnten.

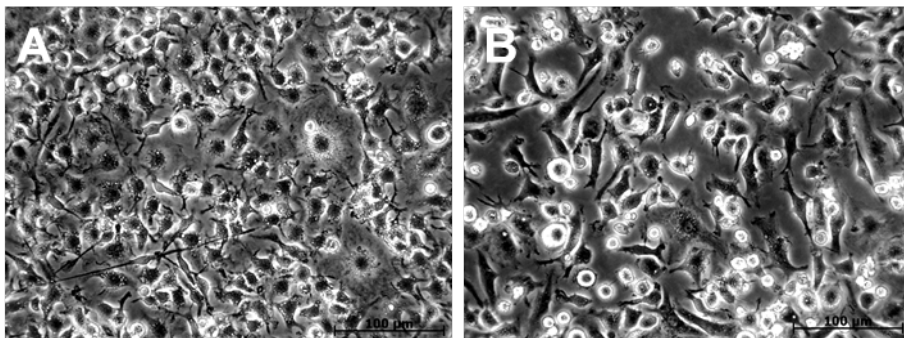


Abbildung 31: Kultur von Makrophagen (BMDMs) und Dendritischen Zellen (BMDCs). Dargestellt sind Zellkulturen aus hämatopoetischen Stammzellen, die zum einen (A) durch den Mediumzusatz von M-CSF zu Makrophagen ausgereift sind und zum anderen (B) durch den Zusatz von GM-CSF zu dendritischen Zellen (Vergrößerung: 200fach).

Populationen von BMDMs und BMDCs wurden am Durchflusszytometer auf Signale der folgenden Antikörperkombinationen untersucht: BMDM: F4/80⁺/MHC II⁺ und BMDC: CD11c⁺/MHC II⁺. Bei der Betrachtung der Makrophagen (Abb. 32) wird deutlich, dass nur etwa 37% der F4/80⁺ Zellen auch MHC II⁺ sind (Kontrolle). Im Plot der UDCA-behandelten BMDMs bietet sich ein vergleichbares Bild. Nur etwa 32% aller Makrophagen sind hier für beide Marker positiv. Signifikant reduziert ist die MHC II Expression nur im *nor*UDCA-Plot. Unter Inkubation mit *nor*UDCA konnten zwar über 85% Makrophagen aus Knochenmarkszellen generiert werden (oberes, linkes Panel), aber nur 5% dieser Makrophagen zeigten auch ein MHC II Signal. Die Ausbeute der doppelpositiven (CD11c/MHC II) dendritischen Zellen aus Knochenmarkszellen war deutlich höher. Alle CD11c positiven Zellen zeigten ein

MHC II Signal in der Kontroll- und in der UDCA-Gruppe (Kontrolle 49% und UDCA 48%). Die Inkubation mit *nor*UDCA führte auch hier zu einem deutlichen Verlust des MHC II Signals im Vergleich zu den unbehandelten BMDCs (*nor*UDCA 28%).

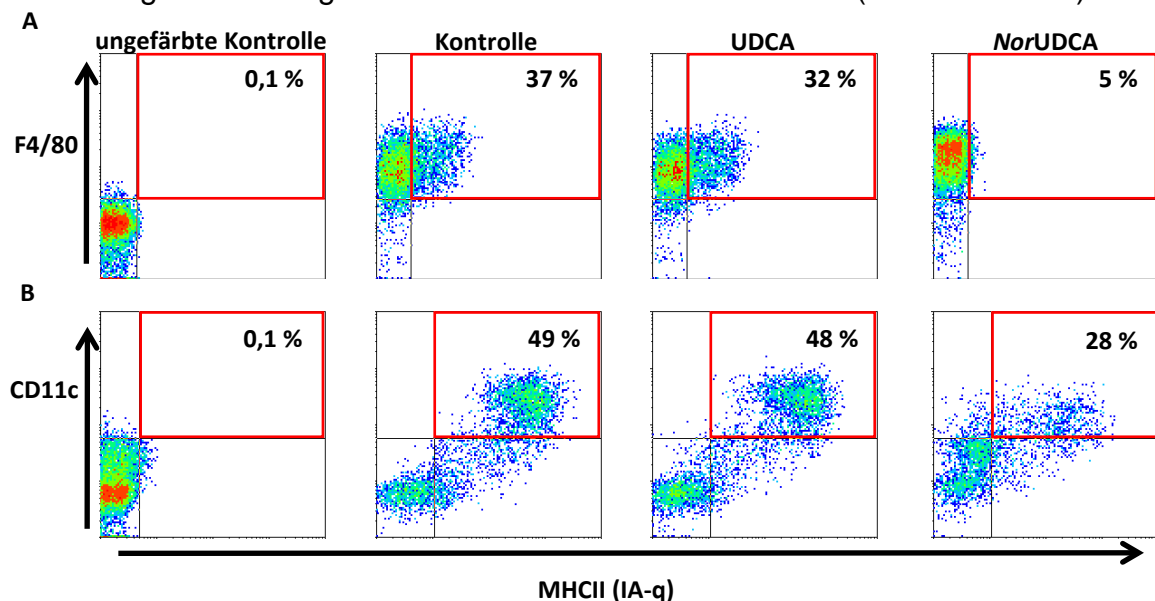


Abbildung 32: *Nor*UDCA reduziert die Expression von MHC II – Molekülen auf der Oberfläche von BMDMs (Makrophagen) und BMDCs (Dendritische Zellen). Hämatopoetische Stammzellen uninfizierter Mäuse wurden isoliert und mit UDCA (50µm) und *nor*UDCA (500µm) inkubiert. Nach 5 Tagen waren die BMDMs zu Makrophagen und die BMDCs zu dendritischen Zellen ausgereift. Die Analyse am Durchflusszytometer ergab eine deutliche Reduktion der Anzahl doppelpositiver (jeweils oberes, rechtes Panel, rot umrandet) Zellen nach der Inkubation mit *nor*UDCA, während UDCA keinen Einfluss auf die Antigenpräsentation der beiden APC-Zellarten hatte.

5.3.5.2 *Nor*UDCA hemmt die Proliferation von aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten

Um mögliche Konsequenzen des oben gemessenen Funktionsverlustes der APCs zu testen, wurde im Folgenden *in vitro*-Ansatz überprüft, in wieweit *nor*UDCA einen Einfluss auf die Aktivierung von T-Lymphozyten hat. Eine Stimulation mit CD3/CD28 Antikörpern bietet die Möglichkeit die Antigenpräsentation von Makrophagen und Dendritischen Zellen nachzuahmen. Die folgende Abbildung (Abb. 33) zeigt, dass eine Stimulation mit diesen Antikörpern zu einer starken Proliferation führt. UDCA hat hier keinen hemmenden Effekt. Eine Inkubation mit *nor*UDCA allerdings verhindert die Aktivierung und somit Proliferation. In diesem Versuchsansatz konnten keine zytotoxischen Einflüsse der Gallensäuren gemessen werden.

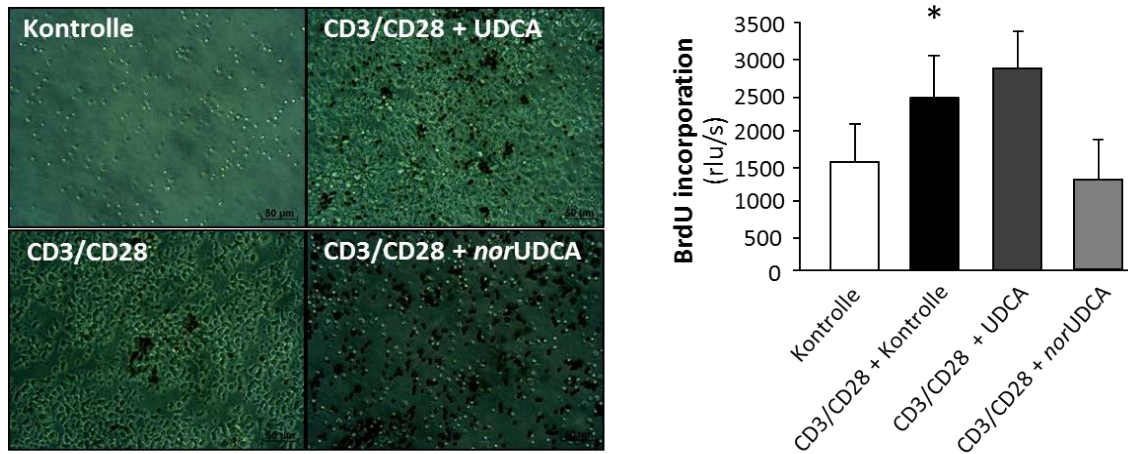


Abbildung 33: NorUDCA verhindert die Aktivierung und Proliferation von CD4⁺ T-Lymphozyten. CD4⁺ Lymphozyten wurden aus isolierten Lymphknoten chronisch infizierter Mäuse (8 Wochen *S. mansoni* Infektion). CD⁺ Lymphozyten wurden mit CD3/CD28 Dynabeads reaktiviert. NorUDCA inhibiert signifikant die T-Zellproliferation, nachgewiesen durch den BrdU-Einbau. * $p < 0.05$ (vs. Kontrolle).

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die entzündungsassoziierte Leberfibrose im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion im Hinblick auf bislang nicht untersuchte, äußerst potente Fibrosemmediatoren, wie die Gallengangsschädigung und die Beeinflussung von Kernrezeptoren (FXR), zu untersuchen. Darüber hinaus sollten herkömmliche (UDCA) und neuartige (*nor*UDCA) Gallensäuren als Kernrezeptorliganden mit antiinflammatorischem und/oder antifibrotischem Potential auf ihre therapeutische Wirksamkeit im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion getestet werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf der Infektion mit *S. mansoni* zu einer starken Beeinflussung der intrahepatischen Gallengänge kommt. Neben den Anzeichen einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), angezeigt durch eine gesteigerte Expression von VCAM-1 der beeinflussten Cholangiozyten, konnten wir zeigen, dass auch Hepatozyten, die im direkten Kontakt zum granulomatösen Entzündungsherd stehen, einen „reaktiven“ Phänotyp ausbilden und VCAM-1 exprimieren. Aufgrund fehlender Cholestasemarkers wurde die Alteration der Gallengänge im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion als sekundäre Veränderung durch das Entstehen großflächiger Granulome in den Portalfeldern angesehen und die Fibrose in der *S. mansoni* Infektion als nicht cholestatisch und nicht primär biliär charakterisiert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Fibrosierung der Leber in diesem nicht cholestatischen Fibrosemodell nicht durch den Kernrezeptor FXR gesteuert wird. Dennoch konnten wir erstmalig zeigen, dass eine 4-wöchige Therapie mit der stark hydrophilen Gallensäure *nor*UDCA zu einer signifikanten Reduktion der Entzündung in der Leber, zur Reduktion der Granulomgröße und zum Rückgang der hepatischen Fibrose führt.

6.1 Versuchsteil A - Der zeitliche Verlauf der *Schistosoma mansoni* Infektion

6.1.1 Die Gallengangsschädigung – sekundärer Nebeneffekt oder aktiver Player?

Das Mausmodell der *S. mansoni* Infektion ist charakterisiert durch eine starke porto-portale Fibrose mit geringer Hepatozytenschädigung (Andrade *et al.* 2004). In unserem Versuchsansatz konnte dies durch gleichbleibende Werte der Lebertransaminasen (ALT, AST) nach Infektion bestätigt werden. Ein gesondertes Interesse lag hier aber in der Auswertung spezifischer Cholestasemarkers (AP und Bilirubin) im zeitlichen Verlauf der Infektion. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt konnte innerhalb dieser Studie eine Erhöhung der Cholestasemarkers erfasst werden. Da die

Schädigung der Leber bzw. der Gallengänge in der *S. mansoni* Infektion innerhalb der Leber liegt, wurden die Lebern der Versuchstiere auf Anzeichen einer intrahepatischen Cholestase hin untersucht. Klassische Beispiele für intrahepatisch, cholestatische Krankheitsbilder sind die Primär biliäre Zirrhose (PBC) oder die Primär sklerosierende Cholangitis (PSC) (Penz-Österreicher *et al.* 2011). Im Verlauf beider Erkrankungen (Hohenester *et al.* 2009; Silveira & Lindor 2008) kommt es zum deutlichen Anstieg der AP und des konjugierten Bilirubins im Serum. In diesem Versuchsansatz kam es zwar zum signifikanten Anstieg der AP nach Infektion, aber in beiden infizierten Gruppen (8 Wo pi und 24 Wo pi) lagen die AP-Werte deutlich unter den Werten, die als erhöht bzw. cholestatisch bewertet werden können. Das Mdr2-/- Mausmodell dient als Modell der Primär sklerosierenden Cholangitis mit ausgeprägter Cholestase. Die AP-Werte dieser Tiere erreichen 250 U/L (Fickert *et al.* 2006). Nach Gallengangsligatur (*bile duct ligation*, BDL), einem anderen Modell zum Verursachen einer Cholestase erreichen die AP-Level das 25-fache der hier gemessenen Werte (Wagner *et al.* 2003). Da im *S. mansoni* Mausmodell vergleichbare Anstiege nicht zu messen waren, wurde dieses Mausmodell als Fibrosemodell ohne primär biliären, cholestatischen Hintergrund charakterisiert. Ein Parasiten-Ei, das in die Leber gespült wird, bildet im Portalfeld ein Granulom aus, welches im Verlauf fibrosiert. Die Granulome nehmen den Platz im Bereich der Portalfelder ein, den Arterie (*Arteria interlobularis*), Vene (*Vena interlobularis*) und Gallengang (*Ductus biliferus*), zusammen „Glisson-Trias“, benötigen (Guyot *et al.* 2003). Die platzfordernden Granulome verschieben die Gallengänge, welche mit einer Neubildung (Gallengangsproliferation) reagieren. In cholestatischen Lebererkrankungen kommt es durch die entzündungsassoziierte Zerstörung der bestehenden intrahepatischen Gallengänge zum Verlust dieser und zur Gallengangsneubildung (Berg 2011). Im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion konnten wir diesen Verlust von Gallengängen nicht erkennen. Eine idiopathische Duktopenie (Verringerung der Anzahl intrahepatischer Gallengänge, *vanishing bile-duct syndrome*, VBDS) als weiteres Anzeichen eines cholestatischen Krankheitsbildes (Desmet 1998) wurde durch einen auf Lebererkrankungen spezialisierten Pathologen an der Medizinischen Universität Graz durch die verblindete Analyse von Leberschnitten mikroskopisch ausgeschlossen. Die stattdessen beobachtete Gallengangsproliferation wurde aufgrund dessen als „sekundärer“ Nebeneffekt der Granulombildung bewertet. Diese Diagnose wurde

durch immunhistochemische Färbungen gegen K19, als Marker für Gallengangsneubildung (Fischer *et al.* 1995), untermauert. K19 positive Cholangiozyten waren in unseren Leberschnitten überwiegend in Gallengängen lokalisiert, die durch hepatische Granulome „verdrängt“ wurden. Eine Gallengangshyperplasie, hervorgerufen durch Parasiten in den Gallengängen oder durch andere Lebererkrankungen, wie Lebertumoren oder Cholestase, wurde bereits beschrieben (Lim *et al.* 2007; Jain & Nayak 2012). In Mitleidenschaft gezogene Gallengänge können potente „Trigger“ einer Leberfibrose sein. Ihre Fähigkeit zur epithelial-mesenchymatischen Transition (EMT) kann reaktive Cholangiozyten zu Kollagen-produzierenden Myofibroblasten-ähnlichen Zellen und somit zu aktiven Mitspielern in der Fibrosierung der Leber machen (Svegliati- Baroni *et al.* 2008; Österreicher & Trauner 2012). Darüber hinaus sind sie in der Lage durch die Expression von MHCII auch als Immunmodulatoren in der Leber zu wirken (Golbar *et al.* 2012, Leon *et al.* 1996). Im *S. mansoni* Mausmodell konnten wir durch das Anfärben von Entzündungszellen (Antikörperfärbung gegen CD4, CD8, CD11b) keine explizite Akkumulation von Entzündungszellen in den Gallengängen erkennen. Die Entzündungsherde stellten hier deutlich die periovalen Granulome dar. Dennoch konnten wir „reaktive“ Cholangiozyten im Bereich der Granulome sehen. Zeichen hierfür waren vereinzelte VCAM-1 positive Cholangiozyten. VCAM-1 als Marker für aktiviertes Gallengangsepithel (Fickert *et al.* 2006) wurde zwar hauptsächlich im äußeren Rand der Ei-Granulome, aber auch zu einem geringen Teil in den von der Granulombildung betroffenen Gallengängen detektiert. Die Hepatozyten, die in erster Reihe an ein Granulom grenzen, zeigten in diesen Versuchen hingegen eine starke VCAM-1 Expression. Auch Hepatozyten sind in der Lage, in das Entzündungsgeschehen der Leber einzugreifen (Böttcher *et al.* 2011). VCAM-1 exprimierende Hepatozyten könnten in unserem Modell weitaus effektiver zur Granulombildung beitragen als reaktives Gallengangsepithel. Gerade die deutliche Beschränkung der VCAM-1 positiven Hepatozyten auf den äußeren Rand der Granulome in Kombination mit der Lokalisation von α -SMA positiven Zellen, ebenfalls beschränkt auf diesen Bereich, deutet auf eine intensive interzelluläre Kommunikation hin. Diese verläuft aber höchstwahrscheinlich durch das Fehlen K19 positiver Zellen unabhängig von den beeinflussten Cholangiozyten. Nichtsdestotrotz haben wir auch vereinzelt VCAM-1 positive Cholangiozyten im Bereich der

Gallengänge beobachtet und können somit einen immunmodulatorischen Effekt dieser Zellen nicht gänzlich ausschließen.

6.1.2 MMPs und TIMPs: Marker zur quantitativen Bewertung der Fibrose

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) spielen eine zentrale Rolle im Kollagen-Metabolismus und werden durch ihre Inhibitoren TIMPs reguliert (Marchenko *et al.* 2003; Hemmann *et al.* 2007). Unter normalen (gesunden) Bedingungen in der Leber sind Matrixdegradation und deren Inhibition ausgeglichen (Gomez *et al.* 1997).

Gesunde NMRI Mäuse zeigten in der vorliegenden Studie minimale mRNA-Expressionswerte von MMP-2 und TIMP-1 an. Nach der Infektion mit *S. mansoni* Infektion war die Expression von TIMP-1 und MMP-2 in den Lebern der Versuchstiere signifikant erhöht. Die MMP-2 Expression stieg auf das 12fache an (8 und 24 Wo pi). Die TIMP-1 Expression erreichte Werte, welche die gesunden Tiere um das 38-(8 Wo pi) bzw. 47fache (24 Wo pi) überstiegen. Es zeigte sich demnach eine massive Verschiebung der ursprünglichen Expression MMP-2 und TIMP-1. Eine Störung des Gleichgewichtes von Matrixdegradation (MMP-Expression) und ihrer Inhibition (TIMP-Expression) wird nicht nur in der hepatischen Fibrose (Roderfeld *et al.* 2007) als Zeichen für den Krankheitsverlauf gewertet. So spielt beispielsweise eine gegenüber MMP-2 gesteigerte TIMP-Expression eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Prostatakrebs (Reis *et al.* 2012) oder der Lungenfibrose (Leco *et al.* 2006). Auch in parasitären Erkrankungen wie der viszerale Leishmaniose steuert TIMP-1, die durch MMPs vermittelte Entzündung. Singh und Kollegen (Singh *et al.* 2006) konnten zeigen, dass ein Ungleichgewicht beider Faktoren auch in der hepatischen Fibrose der *S. mansoni* Infektion eine wichtige Rolle spielt. Hier wurden Lebergranulome isoliert und die MMP-2 und TIMP-1 Expression, die hier überwiegend von Leukozyten sezerniert wurden, analysiert. In der vorliegenden Studie wurde die Gesamt-mRNA der Lebern der Versuchstiere analysiert, um im Gegensatz zur oben erwähnten Studie nicht nur den Beitrag der Entzündungszellen zu erfassen, sondern darüber hinaus auch den Beitrag der Fibroblasten (Herbst *et al.* 2005). Denn wie oben schon erwähnt, sind auch Cholangiozyten und Hepatozyten in der Lage, den Krankheitsverlauf in der Leber durch Transition und Veränderung ihres Phänotyps zu beeinflussen, ohne dabei Teil des hepatischen Granuloms zu sein. Eine Gesamt-RNA Analyse der Leber in Bezug auf die MMP-2 und TIMP-1 Expression scheint daher notwendig. Die Ergebnisse dieser Arbeit und die der oben

erwähnten Studie sind dennoch ähnlich. Auch Singh und Kollegen konnten die massiv übersteigerte TIMP-1 Expression gegenüber MMP-2 messen und bewerteten dies als ursächlich für eine voranschreitende Fibrose. Ein zeitlicher Verlauf wurde hier allerdings nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde ein früher Zeitpunkt nach Beginn der Eiablage (8 Wo pi) und ein später Zeitpunkt nach Beginn der Eiablage (24 Wo pi) zur Analyse des MMP/TIMP Einflusses analysiert. Deutlich wurde hier die signifikant erhöhte Expression von TIMP-1 (47fach) 24 Wo pi im Vergleich zum Zeitpunkt 8 Wo pi (38fach). Verglichen mit den Hydroxyprolinwerten, die ebenfalls zur 24igsten Woche hin signifikant angestiegen sind, sieht man hier erstmalig einen deutlichen Hinweis auf die direkte Korrelation von MMP-2/TIMP-1 und dem Voranschreiten der hepatischen Fibrose. Zusammenfassend ist demnach zu sagen, dass ein Ungleichgewicht zwischen MMP-1 und TIMP-2 zur Fibrosierung der Leber im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion beiträgt. Darüber hinaus lassen sich eindeutige Hinweise auf das quantitative Voranschreiten der hepatischen Fibrose am Verhältnis von MMP-2 und TIMP-1 erkennen. Je stärker TIMP-1 gegenüber MMP-2 exprimiert ist, desto stärker ist die Fibrose. Dies kann selbstverständlich nur eine tendenzielle Aussage sein, da die Regulation von MMP-2 und TIMP-1 wesentlich komplexer ist und weit mehr Faktoren berücksichtigt werden müssen, in Bezug auf die MMP-2/TIMP-1 - Wechselwirkung, als auch die hepatische Fibrose im *S. mansoni* Mausmodell (Loebermann, Sombetzki *et al.* 2009).

6.2 Versuchsteil B: Die Rolle des Farnesoid X Rezeptors in der granulomatösen Leberfibrose der *Schistosoma mansoni* Infektion

6.2.1 Leberzellschäden: FXR knock-out oder Infektion?

Die Depletion von FXR in Mäusen führt in dieser Studie zu einem signifikanten Anstieg der Transaminasen AST und ALT als Zeichen einer massiven Leberzellschädigung. In unterschiedlichen Studien wird dieser Effekt dem gestörten Gallensäuretransport in die Hepatozyten zugesprochen. FXR^{-/-} Mäuse sind gegenüber ihren Wildtypen nicht in der Lage, die Gallensäureaufnahme über Natrium-Symport-Transportproteine (Ntcp, *Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide*) herunter zu regulieren (Wolters *et al.* 2002). Bei gleichbleibender Funktion des Transportes aus den Hepatozyten heraus durch ATP-abhängige Transporter (BSEP, *bile salt export pump*) führt dies zu einem Ungleichgewicht der Gallensäureaufnahme durch Hepatozyten und deren Transport in die Gallengänge.

Dies wiederum führt zu einer dauerhaften Entzündung und somit zu einem erhöhten Leberkrebsrisiko (Wolfe *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2012; Yang *et al.* 2007). Leberzellnekrosen, die sich in erhöhten Transaminasewerten widerspiegeln, sind die Folge. In dieser Studie wurden sowohl Wildtyp als auch FXR-Knockout-Mäuse mit *S. mansoni* infiziert. Deutlich wurde hier, dass die Infektion keinen zusätzlichen Beitrag zur Leberzellschädigung in der FXR-/- Gruppe lieferte. Dies spricht dafür, dass sich die hervorgerufene Entzündung auf die abgekapselten periovalen Granulome beschränkt und das Leberparenchym durch die Infektion nicht beeinflusst wird.

6.2.2 FXR – ein Modulator der nicht biliären Leberfibrose?

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass die Depletion von FXR keinen Einfluss auf den Grad der hepatischen Fibrose in den Versuchstieren hatte. Fiorucci und Kollegen (Fiorucci *et al.* 2005) konnten zeigen, dass HSCs FXR exprimieren. Eine Aktivierung von FXR führt hier zur Shp-abhängigen Blockade der JunD Bindung an die AP1-Bindestelle des TIMP-1-Promotors und somit zur reduzierten Expression von TIMP-1. Da TIMP-1 unter anderem das Überleben von Stellatzellen steuert, wird hierdurch die Apoptoseneigung von aktivierten HSCs gesteigert. Diese und andere Studien führten zur Hypothese, dass das Ausschalten von FXR zur deutlichen Verschlechterung der hepatischen Fibrose im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion führt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in einer vergleichenden Analyse verschiedener hepatischer Fibrosemodelle in Mäusen durchgeführt und publiziert (Fickert *et al.* 2009). In dieser Arbeit wurden zwei Fibrosemodelle mit biliärem Hintergrund (Gallengangsligation, *bile duct ligation*, BDL 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidin, DDC) und zwei nicht cholestatische Fibrosemodelle (Tetrachlorkohlenstoff-Intoxikation, CCl₄ und *S. mansoni* Infektion) miteinander verglichen. Sowohl in DDC als auch BDL Mäusen führte die Depletion von FXR zu einer Reduktion der hepatischen Fibrose. Die Fibrose in CCl₄ und der *S. mansoni* Infektion verlief unbeeinflusst von FXR. Dies steht nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen der oben erwähnten Studie, denn schließlich wurde FXR hier durch einen potenten Liganden aktiviert und eine Depletion von FXR muss daher nicht unbedingt entgegengesetzte Ergebnisse zeigen. Dennoch bleibt die Frage bestehen, inwieweit eine Aktivierung von FXR durch einen Liganden, z.B. Chenodeoxycholsäure im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion, die Fibrosierung der Leber beeinflussen könnte. Eine eigene, unveröffentlichte Studie als Vorversuch zur folgenden Gallensäuretherapiestudie zeigte allerdings eine drastische

Verschlechterung des Krankheitsbildes von *S. mansoni* infizierten Mäusen, die Chenodeoxycholsäure als Futterzusatz über geplante 4 Wochen erhielten. Die Hälfte der Tiere dieser Versuchsgruppe überlebte das Ende der Studie nicht. Eine Reduktion der Fibrose war bei den verbliebenen Tieren nicht zu messen. Daher kann gesagt werden, dass FXR im Mausmodell der *S. mansoni* keine regulatorische Funktion einnimmt. Im Gegensatz dazu, scheint eine gezielte Aktivierung von FXR zur Verschlechterung dieses Krankheitsbildes zu führen.

6.3 Versuchsteil C - Gallensäuretherapie

Im abschließenden Versuchsteil dieser Arbeit wurden zwei Gallensäuren im direkten Vergleich zueinander auf ihre antifibrotischen und antiinflammatorischen Fähigkeiten im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion untersucht. Wir konnten zeigen, dass eine 4-wöchige Therapie mit *norUDCA* im Gegensatz zu UDCA zu einer deutlichen Reduktion der Entzündung in den Lebern der infizierten Tiere führte und darüber hinaus zu einer Verkleinerung der Ei-Granulome verbunden mit einer deutlich geringeren Fibrose. Erste Hinweise auf die hohe therapeutische Wirksamkeit von *norUDCA* konnten Fickert und Kollegen (Fickert *et al.* 2006) bereits in einem cholestatischen Mausmodell mit biliärer Fibrose zeigen. In *Abcb4*^{-/-} Mäusen mit charakteristischen Merkmalen einer sklerosierenden Cholangitis, konnte erstmalig gezeigt werden, dass *norUDCA* im Vergleich zu UDCA antifibrotische Effekte hat. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren darüber hinaus, dass *norUDCA* auch in einem Fibrosemodell ohne cholestatischen Hintergrund gegenüber UDCA wirksam gegen die hepatische Fibrose ist und möglicherweise eine vielversprechende Therapie gegen die besondere Form der Leberfibrose im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion darstellen könnte.

Gallensäuren werden zur Therapie von Lebererkrankungen unterschiedlichster Art mit cholestatischem Hintergrund eingesetzt. Und obwohl in dieser Arbeit keine Hinweise auf einen cholestatischen und/oder biliären Krankheitshintergrund der *S. mansoni* Infektion gefunden wurden und selbst die Therapie mit Chenodeoxycholsäure als Hauptligand von FXR fehlgeschlagen ist, wurde postuliert, dass die künstliche, extrem hydrophile Gallensäure *norUDCA*, sowohl in das Entzündungsgeschehen der Leber eingreifen kann, als auch die Ausbildung der hepatischen Fibrose beeinflusst.

6.3.1 *NorUDCA* und die granulomatöse Entzündung

Wie bereits beschrieben wurde werden Entzündung und Fibrose während einer Infektion mit *S. mansoni* weitgehend getrennt reguliert und ihre Ausprägung hängt davon ab, welches immunologische Milieu vorliegt (Stadecker *et al.* 2004). Eine starke anhaltende Entzündung hervorgerufen durch eine anhaltende Th1-Reaktion führt in den meisten Fällen zu einem schweren Krankheitsverlauf mit großen Granulomen und starker Leberschädigung (Shainheit *et al.* 2011). Die Th1-Reaktion wird durch die Th2-Reaktion kontrolliert und durch diese mit Beginn der Eiablage abgelöst, um eine überschießende Entzündung zu verhindern (Hernandez *et al.* 1999). In NMRI-Mäusen ohne zusätzliche Beeinflussung des Zytokinprofils dominiert 16 Wochen nach der Infektion die Th2-Reaktion. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ist zu erkennen, dass eine Reduktion der Th1-Zytokine keinen Einfluss auf die Fibrosierung hat. UDCA hatte einen zu *norUDCA* vergleichbar starken reduzierenden Effekt auf die Expression von proinflammatorischen Genen wie TNF- α , IFN- γ , IL-1 β und iNOS. Histologisch war diese Reduktion der Entzündung anhand der Granulomgröße im Fall von UDCA aber nicht zu erkennen. Dennoch haben die immunhistochemischen Färbungen einen deutlich aufgelockerten Zellverband in den hepatischen Granulomen der UDCA-behandelten Tiere gezeigt. Der Granulomdurchmesser und die Ausprägung der fibrotischen Septen blieben allerdings unbeeinflusst. Immunmodulatorische Fähigkeiten von UDCA sind bekannt (Calmus *et al.* 1992; Trauner & Graziadei 1999). Der Anteil von UDCA im menschlichen Gallensäurepool beträgt nicht mehr als 3%. Eine orale UDCA-Applikation erhöht diesen Anteil auf über 40%, wodurch die vielfältige Wirkung zum Tragen kommt. Als äußerst hydrophile Gallensäure wirkt UDCA protektiv auf Zellen (v.a. Cholangiozyten) und reduziert so die Entzündung, hervorgerufen durch toxische Gallensäuren. Die Erhöhung der Gallensäuresekretion durch die Beeinflussung von Transportproteinen (Beuers & Lindor 2011; Beuers *et al.* 2009) und der Schutz gegen Gallensäure-induzierte Apoptose von Hepatozyten (Benz *et al.* 2000) gelten als Hauptwirkungsmechanismen von UDCA. Die positiven Effekte von UDCA wirkten sich in der vorliegenden Studie aber nicht auf die Fibrosierung aus. Bei *norUDCA* hingegen konnte sowohl eine Senkung der Expressionswerte der proinflammatorischen Zytokine gemessen werden, als auch eine signifikante Reduktion der Fibrose. Dies ist zum einen ein weiterer Hinweis darauf, dass in diesem Mausmodell Entzündung und Fibrose zumindest zu einem Teil getrennt

reguliert werden und zum anderen, dass *norUDCA* eine andere Wirkungsweise haben muss, als UDCA. Fickert und Kollegen (Fickert *et al.* 2006) postulierten, dass *norUDCA* aufgrund seiner gegenüber UDCA erhöhten Hydrophilie, einen choleretischen (Galle absondernd) Effekt im Mdr2 $-/-$ Mausmodell hat. Abcb4 codiert das Protein Mdr2 (*multidrug resistance protein*), das Maus-Ortholog zum Mdr3 beim Menschen. Die Depletion dieser kanalikulären Phospholipid Flippase führt dazu, dass diese Mäuse keine Phospholipide mehr aus den Hepatozyten in die Galle sezernieren können. Die Bildung gemischter Mizellen aus Phospholipiden und Cholesterin zum Schutz des Gallengangsepithels bleibt aus. Die Folge ist eine anhaltende Schädigung der Gallengänge durch toxische Gallensäuren und die Ausbildung einer sklerosierenden Cholangitis mit porto-portaler Fibrose. Es wird postuliert, dass durch die Zugabe stark hydrophiler Gallensäuren diese Schädigung abgeschwächt wird. Dieser eher „physikalische Effekt“ beider Gallensäuren kann aber im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion nicht der Grund für das verbesserte Krankheitsbild sein, da hier weder cholestatische Bindungen vorliegen, noch ein schädigender toxischer Gallensäurepool.

Deutlich wird aber auch im vorliegenden Mausmodell die stark erhöhte intrahepatische Konzentration von *norUDCA*. Die hohen Gallensäurespiegel der *norUDCA*-behandelten Tiere sind dabei nicht Anzeichen einer Cholestase, sondern deuten vielmehr auf die Besonderheiten im Metabolismus dieser Gallensäure hin. Die hohe biologische Verwertbarkeit von *norUDCA* durch eine nahezu fehlende Konjugation führen zu einer veränderten Zirkulation der Gallensäure (Halilbasic *et al.* 2009; Hofmann 2005). *NorUDCA* durchläuft nicht die für Gallensäuren typische enterohepatische Zirkulation, sondern wird von den Hepatozyten in die Galle sezerniert und durch Cholangiozyten resorbiert. Dieser Vorgang wurde als cholehepatische Zirkulation beschrieben und führt zu den beobachteten hohen Serumgallensäurespiegeln und zu einer hohen intrahepatischen Konzentration von *norUDCA* (Fickert *et al.* 2006; Hofmann 1989).

6.3.2 *NorUDCA* und die Th2-Reaktion

Der TGF- β ist ein klassisches profibrotisches Zytokin. Neben der Regulation von u. a. Wachstum, Apoptose und Differenzierung, spielen die Mitglieder der TGF- β Familie eine bedeutende Rolle bei fibroproliferativen Vorgängen aller Organe des Körpers.

Aktiviertes TGF- β steuert die Transformation von Stellatzellen zu stark proliferierenden Produzenten der EZM. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die Expression von TGF- β 1 unter der Infektion stark ansteigt und durch die Behandlung mit UDCA und *nor*UDCA wieder sinkt. Diese Beobachtung stimmt nach unseren Beobachtungen aber nicht mit dem Grad der Fibrose überein, welche ausschließlich durch *nor*UDCA gesenkt wird. Dies ist ein Zeichen dafür, dass TGF- β 1 nicht der Hauptmediator der Fibrose in diesem Tiermodell ist. Als Schlüsselfaktor in der *S. mansoni* induzierten Fibrose gilt das Th2-Zytokin Interleukin 13 (IL-13) (Chiaramonte *et al.* 2003; Wynn *et al.* 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die alleinige Reduktion der Entzündung nicht ausreicht, um die Granulomgröße und den Grad der Fibrose zu reduzieren. Die signifikante Reduktion von IL-13 im Serum der *nor*UDCA behandelten Tiere ist der erste Hinweis auf eine direkte antifibrotische Wirkung dieser Gallensäure in einem nicht cholestatischen Mausmodell. Es ist bereits bekannt, dass IL-13-/- Mäuse nicht mehr in der Lage sind, eine adäquate fibrotische Reaktion auf Ei-Antigene auszubilden (McKenzie *et al.* 1999). Daher kann aus den hier präsentierten Ergebnissen geschlossen werden, dass nicht die Reduktion der Entzündung allein, sondern die zusätzliche oder alleinige Beeinflussung der Th2-Antwort durch *nor*UDCA verantwortlich für den positiveren Krankheitsverlauf der hepatischen Fibrose im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion ist.

6.3.3 *Nor*UDCA und die Antigenpräsentation

Zur weiteren Analyse der immunmodulatorischen Fähigkeiten von *nor*UDCA wurden *in vitro*-Studien durchgeführt, die einen direkten Einfluss von *nor*UDCA auf die an der Granulombildung beteiligten Zellen zeigen sollten. Hierbei wurden die „professionellen“ APCs, Makrophagen und dendritische Zellen untersucht. Die gezeigte Reduktion der MHC II Expression auf der Oberfläche dieser Zellen nach Inkubation mit *nor*UDCA könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass die Antigenpräsentation und die darauffolgende Aktivierung von T-Lymphozyten gestört sind. Dies wiederum könnte die abgeschwächte Th2-Antwort, gefolgt von einer reduzierten Fibrose erklären. Dennoch ist auch UDCA direkt in der Lage die IFN- γ induzierte Expression von MHC II auf Gallengangsepithelzellen und Hepatozyten zu reduzieren (Calmus *et al.* 1990). In unserem Versuchsaufbau hatte die Inkubation mit UDCA keinen Effekt auf die MHC II Expression. Möglicherweise ist der UDCA-Effekt

beschränkt auf diesen durch IFN- γ vermittelten Glukokortikoid-Rezeptor abhängigen Signalweg und somit nur wirksam in Entzündungsvorgängen mit klassisch aktivierten Makrophagen. Während der komplexen immunologischen Vorgänge bei Wurmerkrankungen, z.B. Schistosomen- oder auch Filarieninfektionen, kommt es zur Mobilisierung alternativ aktivierter Makrophagen. Diese tragen IL-4/IL-13 Rezeptoren auf ihrer Oberfläche und werden in profibrotischer Richtung von Zytokinen der Th2-Zellen aktiviert (Adjobimey & Hoerauf 2010; Herbert *et al.* 2004; Pestka *et al.* 2004). Alternativ aktivierte Makrophagen aktivieren ihrerseits Th2-Zellen, welche mit Proliferation und der Sekretion typischer Th2-Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13) reagieren. Inwieweit eine lokale Expansion von T-Zellen am Entzündungsort zur Granulombildung beiträgt, bzw. die Entzündung steuert, wurde bislang nicht genau geklärt (Hogan *et al.* 2002). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Imitation der APC-Stimulation von T-Helfer Zellen mit CD3/CD28 Antikörpern nach *norUDCA* Inkubation völlig ausbleibt. In Gegenwart dieser Gallensäure lassen sich T-Helferzellen nicht mehr aktivieren. Entfernt man die Gallensäure aus dem Medium und aktiviert die Zellen anschließend mit CD3/CD28 Antikörpern, beginnen sie mit der Proliferation. Dieser weitere *norUDCA*-spezifische Effekt könnte erklären, warum in den anti-CD4 gefärbten Leberschnitten deutlich weniger T-Helferzellen zu finden waren. Inwieweit *norUDCA* eine lokale Expansion behindert oder aber die Rekrutierung von T-Helferzellen stört, konnte in diesem Versuchsansatz nicht geklärt werden. An diesem Punkt muss allerdings noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die *norUDCA* Effekte in Konzentrationen hervorgerufen wurden, die 10fach höher waren, als die der UDCA-Konzentration (UDCA 50 μ M; *norUDCA* 500 μ M). Der Grund hierfür liegt in den physiologischen Serumkonzentrationen der Gallensäuren. Wie oben erwähnt, ist die intrahepatische Konzentration von *norUDCA* aufgrund des „cholehepatischen shunts“ etwa um das 10fache höher als die von UDCA. Den hier dargestellten *in vitro* Versuchen gingen Dosisfindungsstudien voraus, die eindeutig belegen, dass *norUDCA* in einer Konzentration von 50 μ M keine Wirkung auf die MHCII-Expression hat. Lediglich die T-Helferzellaktivierung wird auch in dieser geringen *norUDCA*-Konzentration gehemmt. Andererseits ist UDCA in der hohen Konzentration von *norUDCA* stark zytotoxisch. Aufgrund des Metabolismus von UDCA könnten die hohen *norUDCA* Konzentrationen *in vivo* nicht erreicht werden. Im Gegensatz dazu wird *norUDCA*, auch wenn es in geringeren Konzentrationen gefüttert wird, bis zu einer gewissen Konzentration in der Leber kumulieren. Es bleibt

demnach die Frage, ob die Wirksamkeit von *norUDCA* allein in der hohen Applizierbarkeit begründet liegt. Nichtsdestotrotz wird aber deutlich, dass *norUDCA* ein potenter Störfaktor in der profibrotischen Immunantwort ist. Eine weitere Charakterisierung der APC/T-Helferzell – Wechselwirkung ist notwendig, um mehr Informationen über die Wirkung von *norUDCA* und deren Potential, in den komplexen Entzündungsprozess der *S. mansoni* Infektion einzugreifen, zu erhalten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die positiven Effekte von *norUDCA* auf die Granulomgröße und die hepatische Fibrose im Mausmodell der *S. mansoni* Infektion, auf die entzündungshemmenden Eigenschaften dieser Gallensäure, als auch auf eine direkte antifibrotische Wirkung in Bezug auf die Reduktion der Th2-Antwort zurückzuführen sind.

6.3.4 NorUDCA und die antihelminthische Wirkung

Um eventuelle antihelminthische Effekte von *norUDCA* und UDCA ausschließen zu können, wurden adulte Würmer aus Lebern infizierter Mäuse gespült und direkt den beiden Gallensäuren in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt. Beide Gallensäuren konnten hier in hohen Konzentrationen appliziert werden, ohne eine antihelminthische Wirkung über 5 Tage hinweg zu zeigen. Währenddessen wirkte der Goldstandard Praziquantel bereits nach wenigen Stunden tödlich. Zusätzlich haben wir in Leberschnitten die Anzahl der toten und lebenden Eier in hepatischen Granulomen ermittelt. Gelangen die Parasiten-Eier in die Leber, bleibt das im Ei enthaltene Mirazidium noch etwa 3 Wochen vital. Dann stirbt es ab und hinterlässt eine von einem Granulom umgebene leere Eihülle. Wir haben in einem Leberschnitt pro Maus 30 Granulome ausgewertet. Die Anzahl der bereits avitalen Eier war in jeder infizierten Gruppe etwa gleich (Verhältnis vitale Eier mit Mirazidium/avitale Eiern - Kontrolle: 65/57; UDCA: 62/54; *norUDCA*: 68/57).

6.3.5 NorUDCA und die Notwendigkeit einer wirksamen antifibrotischen Therapie der *Schistosoma mansoni* induzierten Leberfibrose

Die Kontrolle der Schistosomiasis ist derzeit beschränkt auf die Kontrolle der Zwischenwirte verbunden mit Bemühungen zur Verbesserung der Wasseraufbereitung und gesundheitlicher Aufklärung und natürlich der verbreiteten Gabe von Praziquantel und Oxamniquine (Keiser *et al.* 2010; Rollinson *et al.* 2012).

Praziquantel ist wirkungsvoll, kostengünstig und hat kaum Nebenwirkungen. In Gebieten mit starkem Resistenz-Aufkommen gegen Praziquantel kommt Oxamniquine zum Einsatz (Renganathan & Cioli 1998; Beckmann *et al.* 2012).

Neuere Forschungsansätze zur Bekämpfung der Schistosomiasis beziehen sich in erster Linie auf die Entwicklung einer adäquaten Immunisierung gegen den Parasiten. Diese wird allerdings dadurch erschwert, dass keine komplette Immunität vom Endwirt ausgebildet wird. Daher wird parallel an Medikamenten gearbeitet, welche die Fertilität der Würmer (Capron *et al.* 2002) bzw. die Entwicklung der Stadien im Körper beeinflussen (McManus & Bartley 2004) beeinflussen.

Zur antifibrotischen Therapie der Schistosomiasis gibt es bereits unterschiedliche Ansätze (Mansy *et al.* 1998; Giboda *et al.* 1994; Reis *et al.* 2001). Die Balance zwischen Entzündung (Th1-Antwort) und Fibrose (Th2-Antwort) ist charakteristisch für die Fibrose in der *S. mansoni* Infektion und gilt als zwingend notwendig, um das Überleben von Wirt und Wurm gleichermaßen zu sichern (Hoffmann *et al.* 2000). In kaum einem anderen Mausmodell mit hepatischer Fibrose wird die Trennung zwischen der Regulation der Entzündung und der Fibrose deutlicher als im Modell der *S. mansoni* Infektion. Stadecker und Kollegen konnten unter Verwendung unterschiedlicher Mausstämmen zeigen, dass eine ausgeprägte Entzündungsreaktion in Folge der Eiablage nicht zwingend zu einer verstärkten Fibrose führt (Stadecker *et al.* 2001). Aber in dieser Studie zeigten Mäuse, die verhältnismäßig kleine Granulome ausbildeten, eine verstärkte Fibrose.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine wirkungsvolle antifibrotische Therapie der *S. mansoni* Infektion gegen die Th2-Reaktion gerichtet sein muss und diese Arbeit erste Hinweise auf die vielversprechende Wirkung der neuen künstlichen Gallensäure *norUDCA* in Bezug auf die granulomatöse Entzündung, die Th2-assoziierte Granulomformation und den Grad der hepatischen Fibrose liefert.

7 Literaturverzeichnis

- Adjobimey T**, Hoerauf A. Induction of immunoglobulin G4 in human filariasis: an indicator of immunoregulation. *Ann Trop Med Parasitol*, 104(6):455-64, 2010.
- Andrade ZA**. Schistosomal hepatopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99(5 Suppl 1):51-7, 2004.
- Andrade ZA**. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunol*, 31(11):656-63, 2009.
- Badawi AF**, Mostafa MH, Probert A, O'Connor PJ. Role of schistosomiasis in human bladder cancer: evidence of association, aetiological factors, and basic mechanisms of carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev*, 4(1):45-59, 1995.
- Beckmann S**, Leutner S, Gougnard N, Dissous C, Grevelding CG. Protein Kinases as Potential Targets for Novel Anti-Schistosomal Strategies. *Curr Pharm Des*, May 11, 2012.
- Benz C**, Angermüller S, Otto G, Sauer P, Stremmel W, Stiehl A. Effect of tauroursodeoxycholic acid on bile acid-induced apoptosis in primary human hepatocytes. *Eur J Clin Invest*, 30(3):203-9, 2000.
- Bergquist NR**, Colley DG. Schistosomiasis vaccine: research to development. *Parasitol Today*, 14(3):99-104, 1998.
- Berhe N**, Myrvang B, Gundersen SG. Intensity of *Schistosoma mansoni*, hepatitis B, age, and sex predict levels of hepatic periportal thickening/fibrosis (PPT/F): a large-scale community-based study in Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg*, 77(6):1079-86, 2007.
- Bergquist R**. Parasitic diseases: chemotherapy with a twist. *Clin Infect Dis*, 50(9):1214-5, 2010.
- Berg PA**. The role of the innate immune recognition system in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis: a conceptual view. *Liver Int*, 31(7):920-31, 2011.
- Beuers U**, Kullak-Ublick GA, Puhl T, Rauws ER, Rust C. Medical treatment of primary sclerosing cholangitis: a role for novel bile acids and other (post-) transcriptional modulators? *Clin Rev Allergy Immunol*, 36(1):52-61, 2009.
- Beuers U**, Lindor KD. A major step towards effective treatment evaluation in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*, 55(6):1178-80, 2011.
- Booth M**, Vennervald BJ, Kabatereine NB, Kazibwe F, Ouma JH, Kariuki CH, Muchiri E, Kadzo H, Ireri E, Kimani G, Mwatha JK, Dunne DW. Hepatosplenic morbidity in two neighbouring communities in Uganda with high levels of *Schistosoma mansoni* infection but very different durations of residence. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 98(2):125-36, 2004.
- Borkham-Kamphorst E**, van Roeyen CR, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *J Hepatol*, 46(6):1064-74, 2007.

- Boros DL**, Pelley RP, Warren KS. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni. *J Immunol*, 114(5):1437-41, 1975.
- Böttcher JP**, Knolle PA, Stabenow D. Mechanisms balancing tolerance and immunity in the liver. *Dig Dis*, 29(4):384-90, 2011.
- Brunet LR**, Dunne DW, Pearce EJ. Cytokine Interaction and Immune Responses during *Schistosoma mansoni* Infection. *Parasitol Today*, 14(10): 422-427, 1998.
- Capron A**, Capron M, Riveau G. Vaccine development against schistosomiasis from concepts to clinical trials. *Br Med Bull*, 62:139-48, 2002.
- Calmus Y**, Weill B, Ozier Y, Chéreau C, Houssin D, Poupon R. Immunosuppressive properties of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids in the mouse. *Gastroenterology*, 103(2):617-21, 1992.
- Camacho M**, Agnew A. *Schistosoma*: rate of glucose import is altered by acetylcholine interaction with tegumental acetylcholine receptors and acetylcholinesterase. *Exp Parasitol*, 81(4):584-91, 1995.
- Chiaramonte MG**, Mentink-Kane M, Jacobson BA, Cheever AW, Whitters MJ, Goad ME, Wong A, Collins M, Donaldson DD, Grusby MJ, Wynn TA. Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. *J Exp Med*, 197(6):687-701, 2003.
- Chitsulo L**, Loverde P, Engels D. Schistosomiasis. *Nat Rev Microbiol*, 2(1):12-3, 2004.
- Cioli D**, Pica-Mattoccia L, Archer S. Antischistosomal drugs: past, present ... and future? *Pharmacol Ther*, 68(1):35-85, 1995.
- Cioli D**. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitol Today*, 14(10):418-22, 1998.
- Cioli D**, Pica-Mattoccia L. Praziquantel. *Parasitol Res*, 90 Supp 1:S3-9, 2003.
- Claudel T**, Zollner G, Wagner M, Trauner M. Role of nuclear receptors for bile acid metabolism, bile secretion, cholestasis, and gallstone disease. *Biochim Biophys Acta*, 1812(8):867-78, 2011.
- de J Ribeiro P**, Narciso JL, de Toledo CF, Borges DR. Gamma-glutamyltransferase decreases in patients with the chronic form of schistosomiasis mansoni treated with ursodeoxycholic acid. *J Clin Pathol*, 58(7):783-4, 2005.
- Doenhoff MJ**, Kusel JR, Coles GC, Cioli D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96(5):465-9, 2002.
- Doenhoff MJ**, Hagan P, Cioli D, Southgate V, Pica-Mattoccia L, Botros S, Coles G, Tchuem Tchuenté LA, Mbaye A, Engels D. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology*, 136(13):1825-35, 2009.

Dussault I, Beard R, Lin M, Hollister K, Chen J, Xiao JH, Chandraratna R, Forman BM. Identification of gene-selective modulators of the bile acid receptor FXR. *J Biol Chem*, 278(9):7027-33, 2003.

El-Lakkany NM, Hammam OA, El-Maadawy WH, Badawy AA, Ain-Shoka AA, Ebeid FA. Anti-inflammatory/anti-fibrotic effects of the hepatoprotective silymarin and the schistosomicide praziquantel against *Schistosoma mansoni*-induced liver fibrosis. *Parasit Vectors*, 11;5:9, 2012.

Fallon PG, Sturrock RF, Niang AC, Doenhoff MJ. Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*, 53(1):61-2, 1995.

Fenwick A. Baboons as reservoir hosts of *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 63(5):557-67, 1969.

Fickert P, Wagner M, Marschall HU, Fuchsbichler A, Zollner G, Tsybrovskyy O, Zatloukal K, Liu J, Waalkes MP, Cover C, Denk H, Hofmann AF, Jaeschke H, Trauner M. 24-norUrsodeoxycholic acid is superior to ursodeoxycholic acid in the treatment of sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology*, 130(2):465-81, 2006.

Fickert P, Fuchsbichler A, Moustafa T, Wagner M, Zollner G, Halilbasic E, Stöger U, Arrese M, Pizarro M, Solís N, Carrasco G, Caligiuri A, Sombetzki M, Reisinger E, Tsybrovskyy O, Zatloukal K, Denk H, Jaeschke H, Pinzani M, Trauner M. Farnesoid X receptor critically determines the fibrotic response in mice but is expressed to a low extent in human hepatic stellate cells and periductal myofibroblasts. *Am J Pathol*, 175(6):2392-405, 2009.

Fiorucci S, Antonelli E, Rizzo G, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Orlandi S, Pellicciari R, Morelli A. The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis. *Gastroenterology*, 127(5):1497-512, 2004.

Fiorucci S, Rizzo G, Antonelli E, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Orlandi S, Pruzanski M, Morelli A, Pellicciari R. A farnesoid x receptor-small heterodimer partner regulatory cascade modulates tissue metalloproteinase inhibitor-1 and matrix metalloprotease expression in hepatic stellate cells and promotes resolution of liver fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*, 314(2):584-95, 2005.

Fiorucci S, Mencarelli A, Distrutti E, Zampella A. Farnesoid X receptor: from medicinal chemistry to clinical applications. *Future Med Chem*, 4(7):877-91, 2012.

Fischer HP, Meybehm M, Zhou H, Schoch J. [Hepatic neoductules]. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 79:36-46, 1995.

Flores-Villanueva PO, Zheng XX, Strom TB, Stadecker MJ. Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment down-regulate egg antigen-specific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. *J Immunol*, 156(9):3315-20, 1996.

Gerbod D, Noël C, Dolan MF, Edgcomb VP, Kitade O, Noda S, Dufernez F, Ohkuma M, Kudo T, Capron M, Sogin ML, Viscogliosi E. Molecular phylogeny of parabasalids inferred from small subunit rRNA sequences, with emphasis on the Devescovinidae and Calonymphidae (Trichomonadea). *Mol Phylogenet Evol*, 25(3):545-56, 2002.

Giboda M, Smith JM, Prichard RK. Reduction in tissue egg load and maintenance of resistance to challenge in mice infected with *Schistosoma mansoni*, following combined treatment with praziquantel and an antifibrotic agent. *Ann Trop Med Parasitol*, 88(4):385-95, 1994.

Golbar HM, Izawa T, Murai F, Kuwamura M, Yamate J. Immunohistochemical analyses of the kinetics and distribution of macrophages, hepatic stellate cells and bile duct epithelia in the developing rat liver. *Exp Toxicol Pathol*, 64(1-2):1-8, 2012.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 74(2):111-22, 1997.

Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet*, 368(9541):1106-18, 2006.

Gryseels B, Mbaye A, De Vlas SJ, Stelma FF, Guissé F, Van Lieshout L, Faye D, Diop M, Ly A, Tchuem-Tchuente LA, Engels D, Polman K. Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. *Trop Med Int Health*, 6(11):864-73, 2001.

Guyot C, Combe C, Desmoulière A. The common bile duct ligation in rat: A relevant in vivo model to study the role of mechanical stress on cell and matrix behaviour. *Histochem Cell Biol*, 126(4):517-23, 2006.

Halilbasic E, Fiorotto R, Fickert P, Marschall HU, Moustafa T, Spirli C, Fuchsbichler A, Gumhold J, Silbert D, Zatloukal K, Langner C, Maitra U, Denk H, Hofmann AF, Hofmann AF. Current concepts of biliary secretion. *Dig Dis Sci*, 34(12 Suppl):16S-20S, 1989.

Hemann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol*, 46(5):955-75, 2007.

Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci (Lond)*, 112(5):265-80, 2007.

Herbert DR, Hölscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, Leeto M, Kirsch R, Hall P, Mossmann H, Claussen B, Förster I, Brombacher F. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity*, 20(5):623-35, 2004.

Herbst H, Wege T, Milani S, Pellegrini G, Orzechowski HD, Bechstein WO, Neuhaus P, Gressner AM, Schuppan D. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol*, 150(5):1647-59, 2005.

Hernandez HJ, Sharpe AH, Stadecker MJ. Experimental murine schistosomiasis in the absence of B7 costimulatory molecules: reversal of elicited T cell cytokine profile and partial inhibition of egg granuloma formation. *J Immunol*, 162(5):2884-9, 1999.

Hillaire S, Boucher E, Calmus Y, Gane P, Ballet F, Franco D, Moukthar M, Poupon R. Effects of bile acids and cholestasis on major histocompatibility complex class I in human and rat hepatocytes. *Gastroenterology*, 107(3):781-8, 1994.

Hohenester S, Oude-Elferink RP, Beuers U. Primary biliary cirrhosis. *Semin Immunopathol*, 31(3):283-307, 2008.

Hoffmann KF, Cheever AW, Wynn TA. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol*, 164(12): 6406-6416, 2000.

Hofmann AF, Zakko SF, Lira M, Clerici C, Hagey LR, Lambert KK, Steinbach JH, Schteingart CD, Olinga P, Groothuis GM. Novel biotransformation and physiological properties of norursodeoxycholic acid in humans. *Hepatology*, 42(6):1391-8, 2005.

Hogan LH, Wang M, Suresh M, Co DO, Weinstock JV, Sandor M. CD4+ TCR repertoire heterogeneity in *Schistosoma mansoni*-induced granulomas. *J Immunol*, 169(11): 6386-6393, 2002.

Holt JA, Luo G, Billin AN, Bisi J, McNeill YY, Kozarsky KF, Donahee M, Wang da Y, Mansfield TA, Kliwer SA, Goodwin B, Jones SA. Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev*, 17:1581–1591, 2003.

http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf

<http://apps.who.int/ghodata/?vid=10015#>

Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 29(1):43-54, 1997.

Ismail MM, Taha SA, Farghaly AM, el-Azony AS. Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis. *J Egypt Soc Parasitol*, 24(3):685-95, 1994.

Jain D, Nayak NC. Bile duct changes in different etiologic types of end-stage chronic liver disease: a study on native explant livers. *J Clin Pathol*, 65(4):348-51, 2012.

Jeziorski MC, Greenberg RM. Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: potential role in praziquantel action. *Int J Parasitol*, 36(6):625-32, 2006.

Keiser J, Duthaler U, Utzinger J. Update on the diagnosis and treatment of food-borne trematode infections. *Curr Opin Infect Dis*, 23(5):513-20, 2010.

Kjetland EF, Ndhlovu PD, Gomo E, Mduluzi T, Midzi N, Gwanzura L, Mason PR, Sandvik L, Friis H, Gundersen SG. Association between genital schistosomiasis and HIV in rural Zimbabwean women. *AIDS*, 20(4):593-600, 2006.

Kisseleva T, Brenner DA. Anti-fibrogenic strategies and the regression of fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 25(2):305-17, 2011.

Knittel T, Saile B, Ramadori G. [Fibrogenesis. Pathophysiology and therapeutic approaches]. *Internist (Berl)*, 39(3):238-46, 1998.

Kok T, Hulzebos CV, Wolters H, Havinga R, Agellon LB, Stellaard F, Shan B, Schwarz M, Kuipers F. Enterohepatic circulation of bile salts in farnesoid X receptor-deficient mice: efficient intestinal bile salt absorption in the absence of ileal bile acid-binding protein. *J Biol Chem*, 278(43):41930-7, 2004.

Leco KJ, Waterhouse P, Sanchez OH, Gowing KL, Poole AR, Wakeham A, Mak TW, Khokha R. Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest*, 108(6):817-29, 2001.

Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 25(2):195-206, 2001.

Leon MP, Bassendine MF, Wilson JL, Ali S, Thick M, Kirby JA. Immunogenicity of biliary epithelium: investigation of antigen presentation to CD4+ T cells. *Hepatology*, 24(3):561-7, 1996.

Lim JH, Kim SY, Park CM. Parasitic diseases of the biliary tract. *AJR Am J Roentgenol*, 188(6):1596-603, 2007.

Lindor KD. New treatment strategies for primary sclerosing cholangitis. *Dig Dis*, 29(1):113-6, 2011.

Loebermann M, Sombetzki M, Langner C, Fuchsbichler A, Gumhold J, Silbert D, Riebold D, Holtfreter M, Fickert P, Nizze H, Trauner M, Reisinger EC. Imbalance of pro- and antifibrogenic genes and bile duct injury in murine *Schistosoma mansoni* infection-induced liver fibrosis. *Trop Med Int Health*, 14(11):1418-25, 2009.

Löscher T, Ruppel A, Schubert S (2000). Schistosomiasis (Bilharziose) und andere Trematodeninfektionen. In: Lang W., Loscher T. (Ed.), *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. 3rd edn., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 101-124.

Kuipers F. Effects of bile salt flux variations on the expression of hepatic bile salt transporters in vivo in mice. *J Hepatol*, 37(5):556-63, 2002.

Maloney PR, Parks DJ, Haffner CD, Fivush AM, Chandra G, Plunket KD, Creech KL, Moore LB, Wilson JG, Lewis MC, Jones SA, Willson TM. Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J Med Chem*, 43:2971-2974, 2000.

- Mansy SS**, Yehia HA, Hassan MM, Hassan EA, Youssef MM, Hadi AA, Mackenzie CD. Octreotide decreases connective tissue formation and improves vascular changes associated with hepatic schistosomiasis. *J Egypt Soc Parasitol*, 28(1):23-44, 1998.
- Makino I**, Nakagawa S. Changes in biliary lipid and biliary bile acid composition in patients after administration of ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res*, 19(6):723-8, 1978.
- Makishima M**, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*, 284(5418):1362-5, 1999.
- Marchenko GN**, Marchenko ND, Strongin AY. The structure and regulation of the human and mouse matrix metalloproteinase-21 gene and protein. *Biochem J*, 372(Pt 2):503-15, 2003.
- Marschall HU**, Wagner M, Zollner G, Fickert P, Lackner C, Thorell A, Trauner M. Ursodeoxycholic acid for treatment of fatty liver disease and dyslipidemia in morbidly obese patients. *Dig Dis*, 29(1):117-8, 2011.
- Mathers CD**, Ezzati M, Lopez AD. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. *PLoS Negl Trop Dis*, 1(2):e114, 2007
- McManus DP**, Bartley PB. A vaccine against Asian schistosomiasis. *Parasitol Int*, 53(2):163-73, 2004.
- McManus DP**, Gray DJ, Li Y, Feng Z, Williams GM, Stewart D, Rey-Ladino J, Ross AG. Schistosomiasis in the People's Republic of China: the era of the Three Gorges Dam. *Clin Microbiol Rev*, 23(2):442-66, 2010.
- Modha J**, Lambertucci JR, Doenhoff MJ, McLaren DJ. Immune dependence of schistosomicidal chemotherapy: an ultrastructural study of *Schistosoma mansoni* adult worms exposed to praziquantel and immune serum in vivo. *Parasite Immunol*, 12(3):321-34, 1990.
- Murray CJ**, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, Fullman N, Naghavi M, Lozano R, Lopez AD. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*, 379(9814):413-31, 2010.
- Neubauer K**, Saile B, Ramadori G. Liver fibrosis and altered matrix synthesis. *Can J Gastroenterol*, 15(3):187-93, 2001.
- Nishimaki-Mogami T**, Une M, Fujino T, Sato Y, Tamehiro N, Kawahara Y, Shudo K, Inoue K. Identification of intermediates in the bile acid synthetic pathway as ligands for the farnesoid X receptor. *J Lipid Res*, 45(8):1538-45, 2004.
- Österreicher CH**, Trauner M. Animal models of biliary tract injury. *Curr Opin Gastroenterol*. 2012 May;28(3):239-43.

- Paumgartner G.** Biliary physiology and disease: reflections of a physician-scientist. *Hepatology*, 51(4):1095-106, 2010.
- Parkin DM.** The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*, 118(12):3030-44, 2006.
- Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM.** Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*, 1365-1368, 1999.
- Parola M, Pinzani M.** Hepatic wound repair. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2(1):4, 2009.
- Pearce EJ, MacDonald AS.** The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol*, 2(7):499-511, 2002.
- Pellegrino J, Lima-Costa FF, Carlos MA, Mello RT.** Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. XIII. Activity of praziquantel, an isoquinoline-pyrazino derivative, on mice, hamsters and Cebus monkeys. *Z Parasitenkd*, 21;52(2):151-68, 1977.
- Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, Clerici C, Costantino G, Maloney PR, Morelli A, Parks DJ, Willson TM.** 6 α -ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J Med Chem*, 45:3569–3572, 2004.
- Penz-Österreicher M, Österreicher CH, Trauner M.** Fibrosis in autoimmune and cholestatic liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 25(2):245-58, 2011.
- Pestka S, Krause CD, Walter MR.** Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*, 202: 8-32, 2004.
- Picquet M, Vercruysse J, Shaw DJ, Diop M, Ly A.** Efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* in northern Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 92(1):90-3, 1998.
- Pinzani M.** PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci*, 1;7:d1720-6, 2002.
- Poovorawan Y, Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Jantaradsamee P, Chutsirimongkol S, Tangkijvanich P.** Clinical features and molecular characterization of hepatitis A virus outbreak in a child care center in Thailand. *J Clin Virol*, 32(1):24-8, 2002.
- Pusl T, Beuers U.** Extrahepatic manifestations of cholestatic liver diseases: pathogenesis and therapy. *Clin Rev Allergy Immunol*, 28(2):147-57, 2005.
- Ramachandran P, Iredale JP.** Reversibility of liver fibrosis. *Ann Hepatol*, 8(4):283-91, 2009.

Ramadori G, Saile B. Inflammation, damage repair, immune cells, and liver fibrosis: specific or nonspecific, this is the question. *Gastroenterology*, 127(3):997-1000, 2004.

Redman CA, Robertson A, Fallon PG, Modha J, Kusel JR, Doenhoff MJ, Martin RJ. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitol Today*, 12(1):14-20, 1996.

Reis LF, Ventura TG, Souza SO, Arana-Pino A, Pelajo-Machado M, Pereira MJ, Lenzi HL, Conceição MJ, Takiya CM. Quantitative and qualitative interferences of pentoxifylline on hepatic *Schistosoma mansoni* granulomas: effects on extracellular matrix and eosinophil population. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96 Suppl:107-12, 2001.

Reis ST, Antunes AA, Pontes-Junior J, de Sousa-Canavez JM, Dall'oglio MF, Piantino CB, da Cruz JA, Morais DR, Srougi M, Leite KR. Underexpression of MMP-2 and its Regulators, TIMP2, MT1-MMP and IL-8, is Associated with Prostate Cancer. *Int Braz J Urol*, 38(2):167-74, 2012.

Renga B, Mencarelli A, Cipriani S, D'Amore C, Zampella A, Monti MC, Distrutti E, Fiorucci S. The nuclear receptor FXR regulates hepatic transport and metabolism of glutamine and glutamate. *Biochim Biophys Acta*, 1812(11):1522-31, 2011.

Renganathan E, Cioli D. An international initiative on praziquantel use. *Parasitol Today*, 14(10):390-1, 1998.

Richter J. Evolution of schistosomiasis-induced pathology after therapy and interruption of exposure to schistosomes: a review of ultrasonographic studies. *Acta Trop*, 23;77(1):111-31, 2000.

Ribeiro F, Coelho PM, Vieira LQ, Powell K, Kusel JR. Membrane internalization processes in different stages of *Schistosoma mansoni* as shown by a styryl dye (Frei Mao 1-43). *Parasitology*, 116 (Pt 1):51-9, 1998

Rippe RA, Umezawa A, Kimball JP, Breindl M, Brenner DA. Binding of upstream stimulatory factor to an E-box in the 3'-flanking region stimulates alpha1(I) collagen gene transcription. *J Biol Chem*, 17;272(3):1753-60, 1997.

Roderfeld M, Hemmann S, Roeb E. Mechanisms of fibrinolysis in chronic liver injury (with special emphasis on MMPs and TIMPs). *Z Gastroenterol*, 45(1):25-33, 2007.

Rollinson D, Knopp S, Levitz S, Stothard JR, Tchuente LA, Garba A, Mohammed KA, Schur N, Person B, Colley DG, Utzinger J. Time to set the agenda for schistosomiasis elimination. *Acta Trop*, 2012.

Saeki R, Ogino H, Kaneko S, Unoura M, Kobayashi K. Effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from patients with primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol*, 30(6):739-44, 1995.

Schuppan D, Popov Y. Hepatic fibrosis: from bench to bedside. *J Gastroenterol Hepatol*, 17 Suppl 3:S300-5, 2002.

Secor WE. Immunology of human schistosomiasis: off the beaten path. *Parasite Immunol*, 27(7-8):309-16, 2005.

Shainheit MG, Lasocki KW, Finger E, Larkin BM, Smith PM, Sharpe AH, Dinarello CA, Rutitzky LI, Stadecker MJ. The pathogenic Th17 cell response to major schistosome egg antigen is sequentially dependent on IL-23 and IL-1 β . *Immunol*, 187(10):5328-35, 2011.

Skelly PJ, Alan Wilson R. Making sense of the schistosome surface. *Adv Parasitol*, 63:185-284, 2006.

Silveira MG, Lindor KD. Primary sclerosing cholangitis. *Can J Gastroenterol*, 22(8):689-98, 2008.

Singh KP, Gerard HC, Hudson AP, Boros DL. Dynamics of collagen, MMP and TIMP gene expression during the granulomatous, fibrotic process induced by *Schistosoma mansoni* eggs. *Ann Trop Med Parasitol*, 98(6):581-93, 2004.

Singh KP, Gerard HC, Hudson AP, Boros DL. Differential expression of collagen, MMP, TIMP and fibrogenic-cytokine genes in the granulomatous colon of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Ann Trop Med Parasitol*, 100(7):611-20, 2006.

Stadecker MJ, Hernandez HJ, Asahi H. The identification and characterization of new immunogenic egg components: implications for evaluation and control of the immunopathogenic T cell response in schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96 Suppl:29-33, 2001.

Stadecker MJ, Asahi H, Finger E, Hernandez HJ, Rutitzky LI, Sun J. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunol Rev*, 201:168-79, 2004.

Stefanovic B, Stefanovic L, Schnabl B, Bataller R, Brenner DA. TRAM2 protein interacts with endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump Serca2b and is necessary for collagen type I synthesis. *Mol Cell Biol*, 24(4):1758-68, 2004.

Strazzabosco M, Trauner M. Side chain structure determines unique physiologic and therapeutic properties of norursodeoxycholic acid in Mdr2^{-/-} mice. *Hepatology*, 49(6):1972-81, 2009.

Svegliati-Baroni G, De Minicis S, Marziani M. Hepatic fibrogenesis in response to chronic liver injury: novel insights on the role of cell-to-cell interaction and transition. *Liver Int*, 28(8):1052-64, 2008.

Tanaka M. Mini-review: the ultrasonographical and serological changes and their improvement after praziquantel treatment in *Schistosoma japonicum* infected patients in Leyte, Philippines. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87 Suppl 4:277-80, 1992.

Trauner M, Graziadei IW. Review article: mechanisms of action and therapeutic applications of ursodeoxycholic acid in chronic liver diseases. *Aliment Pharmacol Ther*, 13(8):979-96, 1999.

Trauner M, Wagner M, Fickert P, Zollner G. Molecular regulation of hepatobiliary transport systems: clinical implications for understanding and treating cholestasis. *J Clin Gastroenterol*, 39(4 Suppl 2):S111-24, 2005.

Trauner M, Fickert P, Baghdasaryan A, Claudel T, Halilbasic E, Moustafa T, Wagner M, Zollner G. New insights into autoimmune cholangitis through animal models. *Dig Dis*, 28(1):99-104, 2010.

Trauner M, Claudel T, Fickert P, Moustafa T, Wagner M. Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism. *Dig Dis*, 28(1):220-4, 2010.

Utzinger J, Raso G, Brooker S, De Savigny D, Tanner M, Ornbjerg N, Singer BH, N'goran EK. Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution. *Parasitology*, 136(13):1859-74, 2009.

Wagner M, Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Silbert D, Tsybrovskyy O, Zatloukal K, Guo GL, Schuetz JD, Gonzalez FJ, Marschall HU, Denk H, Trauner M. Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct-ligated mice. *Gastroenterology*, 125(3):825-38, 2003.

Wagner M, Zollner G, Trauner M. Nuclear receptors in liver disease. *Hepatology*, 53(3):1023-34, 2011.

Wainwright H. Hepatic granulomas. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 19(2):93-5, 2007.

Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell*, 3(5):543-53, 1999.

Wang YD, Chen WD, Wang M, Yu D, Forman BM, Huang W. Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response. *Hepatology*, 48(5):1632-43, 2008.

Wolters H, Elzinga BM, Baller JF, Boverhof R, Schwarz M, Stieger B, Verkade HJ, Wolfe A, Thomas A, Edwards G, Jaseja R, Guo GL, Apte U. Increased activation of the Wnt/ β -catenin pathway in spontaneous hepatocellular carcinoma observed in farnesoid X receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 338(1):12-21, 2011.

Wynn TA, Thompson RW, Cheever AW, Mentink-Kane MM. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunol Rev*, 201:156-67, 2004.

Yang F, Huang X, Yi T, Yen Y, Moore DD, Huang W. Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res*, 67(3):863-7, 2007.

Yoshikawa M, Tsujii T, Matsumura K, Yamao J, Matsumura Y, Kubo R, Fukui H, Ishizaka S. Immunomodulatory effects of ursodeoxycholic acid on immune responses. *Hepatology*, 16(2):358-64, 1992.

Zhang Y, Gong W, Dai S, Huang G, Shen X, Gao M, Xu Z, Zeng Y, He F. Downregulation of human farnesoid X receptor by miR-421 promotes proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer Res*, 10(4):516-22, 2012.

Zhao A, Yu J, Lew JL, Huang L, Wright SD, Cui J. Polyunsaturated fatty acids are FXR ligands and differentially regulate expression of FXR targets. *DNA Cell Biol*, 23:519 –526, 2004.

Zollner G, Wagner M, Moustafa T, Fickert P, Silbert D, Gumhold J, Fuchsbichler A, Halilbasic E, Denk H, Marschall HU, Trauner M. Coordinated induction of bile acid detoxification and alternative elimination in mice: role of FXR-regulated organic solute transporter-alpha/beta in the adaptive response to bile acids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290(5):G923-32, 2006.

Zollner G, Trauner M. Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis*, 12(1):1-26, 2008.

1. Verbrauchsmaterialien

Zellkultur	
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, A
HEPES	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
HEPES-Puffer	Gibco
Brefeldin-A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BSA-Stocklösung, 0,1 mg/ml	Bio-Rad, München, D
RPMI-1640	PAA, Paschingen, A
M-CSF, recombinant, human	ImmunoTools
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
GM-CSF	ImmunoTools
PBS (steril)	PAA, Paschingen, A
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich
Accutase™	PAA, Paschingen, A
Westernblot	
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
EDTA	Merck
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol, reinst und vergällt	Apotheke des Universitätsklinikums Rostock
Essigsäure	Merck
Agarose	Serva, Heidelberg, D
Pikrinsäurelösung, gesättigte, wässrige (1,3%)	Apotheke des Universitätsklinikums Rostock
Ponceau S	Serva
SDS	Carl Roth
TEMED	Serva
Thimerosal	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
PMA	
Tris Base	Carl Roth
Trichloressigsäure (TCA)	Apotheke des Universitätsklinikums Rostock
Trypanblau	Gibco
Trypsin-EDTA, 0,05%	Gibco
Tween 20	Carl Roth
PVFD-Membran	
Coomassie brilliant blue R250	
ELISA-KITs	
<i>mouse specific</i> IL-13 ELISA	eBioscience, San Diego, USA
<i>S. mansoni soluble egg antigen</i> ELISA	IVD Research Inc., Carlsbad, CA
Cell Proliferation ELISA, BrdU chemiluminescent,	Roche
Microbeads	
Streptavidin:Microbeads,	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
B220:MicroBeads (CD45R)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Dynabeads® Mouse CD3/CD28 T Cell Expander	Dynal Hamburg
PCR	
TRIzol®	Invitrogen, Österreich
MagNa Lyser Green Beads	Roche
Randomhexamer	
Chloroform	

SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Österreich
SYBR® Green PCR Mastermix	Invitrogen, Österreich
Sonstige	
Hydroxyprolin-Standard	Sigma-Aldrich
Dimethylbenzaldehyd	Sigma
Citronensäure	Sigma
Chloramin-T-Hydrat	Sigma
Perchlorsäure	Merck
Kaliumaluminiumsulfat	Merck
Ammoniaklösung	Merck Millipore
Eosin/Phloxinlsg.	Sigma
Eukitt	Sigma
Hämatoxylin III nach Gill	Apotheke des Universitätsklinikums Rostock
Formalin	Merck
Hämalaun	Apotheke des Universitätsklinikums Rostock
Medikamente	
24- <i>nor</i> -Ursodeoxycholsäure	Falk
Ursodeoxycholsäure	Falk
Praziquantel	Sigma

2. Geräte und Werkzeuge

Einmalspritzen, steril; 20ml	BD
Greiner Röhrchen; 15ml, 50ml	Greiner
Eppendorf-Tubes; 1,5ml, 2ml	Eppendorf
Kryoröhrchen, 2ml	Nalgene
Petrischalen	Greiner
Glasflaschen, Bechergläser	Schott
Skalpelle	Dahlhausen
Cell Strainer; 40µm, 70µm	BD Falcon
Parafilm, Größe M	American National Can Company
Zellkulturflaschen; 25cm ² , 75 cm ²	NUNC
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1 ml	greiner bio-one
Einwegpipetten 5ml, 10ml, 25ml	greiner bio-one
Präparierbesteck	Dimed, Karl Storz, Aesculap, Chirimed Poland
Zentrifuge Biofuge stratos	Heraeus
Zentrifuge Fresco	NeoLab
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraus
Vortexer MS3 digital	IKAR Works, Inc.
Brutschrank Revco (37°C/ 5%CO ₂)	Thermo Scientific
Flowbox Herasafe KS 12 Thermo	Electron Corporation
Feinwaage Explorer	Ohaus
Präzisionswaage MXX-2001	Denver Instruments
Durchlichtmikroskop CH-2	Olympus
Kaltlichtquelle KL200	Zeiss
Lupe 4-fache Vergrößerung	Eschenbach
Neubauer Zahlkammer	Brandt
FACS Calibur™	Becton Dickinson
Absaugpumpe Vacumat 130	H-Saur, Reutlingen, D
Heizblock HBT-1	HLC, Bovenden, D

7900HT Fast Real-Time PCR Systems	Applied Biosystems
MACS	
Magnetrührer MR-3001	Heidolph, Schwabach, D
Photometer SmartSpec 300	Bio-Rad
Pipetierhilfe „Pipetboy“	
Plattenschüttler Polymax 1040	Heidolph
Wasserbad	GFL, Burgwedel
My Cycler (BIORAD)	
Hitachi-917	Fotometer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)
MagNa-Lyser	Roche
Rotationsrad	
Cryostat-Mikrotoms HYRAX C 25	Carl Zeiss AG
Photometer SmartSpec 3000	Bio-Rad, Hertfordshire, UK

3. Anhang 4.5.2a – Protokoll cDNA/Zyklen

- 65°C für 5 Minuten
- 25°C für 10 Minuten
- 42°C für 90 Minuten
- 70°C für 15 Minuten

4. Anhang 4.5.2b – Mastermix/cDNA-PCR

- 1,75µl Aqua dest.
- 4µl Erst-Strang Puffer (Invitrogen, Österreich)
- 2µl 0.1M DTT (Invitrogen, Österreich)
- 1,25µl GeneAmp® dNTP Blend
- 12,5mM mit dUTP (Applied Biosystems, CA, USA)
- 0,5µl Prime RNase Inhibitor™ (Eppendorf, Deutschland)
- 0,5µl Super Script™ II Reverse Transkriptase (Invitrogen, Österreich)

5. Anhang 4.5.2c – SYBR Green Mastermix und RT-PCR Zyklen

- 5µl verdünnter cDNA
- 15µl SYBR® Green PCR Mastermix (enthält SYBR® Green I Farbstoff, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP, Passive Reference 1 (ROXTM) Farbstoff)
- 2µl von jedem Primer
- 6µl Aqua dest.

- Inkubation bei 50°C für 2 Minuten
- Erhitzung auf 95°C für 10 Minuten
- Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden
- Hybridisierung und Elongation bei 60°C für eine Minute

6. Anhang 4.6.2a – Hämatoxylin/Eosin-Färbung

- Fixierung: Bouin-Fixierung (150ml Pikrinsäurelösung + 50ml Formalin + 10ml Eisessig)
- Technik:
 - 1) Entparaffinisieren der Schnitte bis ins Aqua dest.
 - 2) Hämatoxylin III nach Gill 5min
 - 3) Aqua dest. 3min
 - 4) 1% Kalialaunsg. 5sec
 - 5) Aqua dest. 5sec
 - 6) 0,05% HCL 3sec
 - 7) 0,1% Ammoniaklsg. 30sec
 - 8) Aqua dest. 5sec
 - 9) Eosin/Phloxinlsg. 3min
 - 10) 90% Ethanol
 - 11) 90% Ethanol
 - 12) 100% Ethanol
 - 13) Eindeckeln Eukitt

7. Anhang 4.6.2b – Sirius Red

- Fixierung: Formalin
- Technik:
 - 1) Entparaffinisieren der Schnitte bis ins Aqua dest.
 - 2) Coelestineblau 7min
 - 3) Schnitte direkt ins Hämalan 7min
 - 4) Differenzieren in Salzsäure-Alkohol (1% bzw. 3%)
 - 5) Bläuen der Schnitte 5-10 min
 - 6) Picro-Siriusrot 30 min

7) Rasches Entwässern in 3 x abs. Alkohol, Xylol, Eukitt

- Lösungen:

1) Picro-Siriusrot

2) 0,1% Siriusrot in gesättigter Pikrinsäure

(Gesättigte, wässrige Pikrinsäure: 15g Pikrinsäure in 950ml Aqua dest.)

3) Coelestineblau-Lösung

2,5g Eisenalaun über Nacht in 50 ml Aqua dest., lösen, 0,25g Coelestineblau dazugeben, Gemisch 3 min kochen und filtrieren (herb filtrieren) 7ml Glycerin dazugeben (8,75g)

8. Anhang 4.7.2 - Westernblot

- Zusammensetzung der Lämmli-Gele:

Reagenz	Trenngel 12%	Sammelgel 4,5%
Acrylamid/Bis-Acrylamid ml	8	1,50
Tris/HCl (Sammelgel) ml		1,25
Tris/HCl (Trenngel) ml	8	
Aqua dest. ml	4	7
10% SDS µl	216	100
10% APS µl	160	100
TEMED µl	20	10

- BSA-Standardreihe für den Bradford Assay:

BSA-Gehalt [µg]	BSA-Stock [µl]	RIPA complete [µl]	Aqua dest. [µl]
(BLANK) 0,0	0	2	798
0,5	5	2	793
1,0	10	2	788
2,0	20	2	778
4,0	40	2	758
6,0	60	2	738
8,0	80	2	718
10,0	100	2	698

- Epsilon-Puffer:
40mM Epsilon-Aminocapronsäure, 25mM Tris-Base, 20% Methanol, pH 9,4
- HT-Puffer:
300mM Tris-Base, 20% Methanol, pH 10,4
- LT-Puffer:
25mM Tris-Base, 20% Methanol, pH 10,4
- Blockmilch:
1x TBS, 5% (w/v) Magermilchpulver, 1% (w/v) BSA und 0,02% (w/v) Thimerosal [4°C]
- Laufpuffer:
0,25M Tris-Base, 1% SDS und 1,92M Glycerin
- Tris-HCl: 50mM Tris Base, pH 8.0
- Tris-HCl (Sammelgel): 1M Tris Base, pH 6,8
- Tris-HCl (Trenngel): 1M Tris Base, pH 8,9
- Waschpuffer: 1x TBS, 0,1% (w/v) BSA, 0,05% Tween 20 und 0,02% (w/v) Thimerosal
- Protein-Probenpuffer, 5x: 312,5mM Tris-HCl pH 6,8, 10% (w/v) SDS, 325mM DTT, 4g/L Bromphenolblau und 50% (w/v) Glycerol

9. Anhang 4.8.1 – Medium zur Isolation von Knochenmarkszellen

- Waschmedium (Anhang 4.8.1.a):
RPMI 1640, 10% FBS, 2mM L-Glut, 50µM 2-ME, 10mM HEPES
- Kulturmedium für BMDMs (Anhang 4.8.1b): RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM L-Glut, 50 µM 2-ME, 10 mM HEPES, 50 µg/ml Pen/strep, 40ng/ml mrM-CSF
- Kulturmedium für BMDCs (Anhang 4.8.1b): RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM L-Glut, 50 µM 2-ME, 10 mM HEPES, 50 µg/ml Pen/strep, 10ng/ml GM-CSF

10. Anhang 4.8.2.1 – FACS-Puffer

- PBS, 0.5% FCS, 2mM EDTA

11. Anhang 4.9 – T-Lymphozyten

- T-Zellmedium: RPMI 1640 (PAA), 10% FCS, 1% Pen/Strep (Sigma Aldrich)
- Erythrozytenlysepuffer: 10mM Tris/HCL; 0,165M NH₄Cl

12. Anhang 4.10 – Kultur adulter *Schistosoma mansoni*

- Waschlösung (Anhang 4.10a): 100ml RPMI-1640, 1% Pen/ Strep
- Kultivierung (Anhang 4.10b): 100ml RPMI-1640, 10% FCS, 1% Pen/ Strep

Beruflicher Werdegang

Martina Sombetzki, Dipl.-Biol.

schulische Ausbildung:

1984 - 1993	Polytechnische Oberschule Moltzow
1993 - 1996	Richard-Wossidlow-Gymnasium Waren/Müritz, Abitur

Studium und Beruf

1996-2005	Studium der Biologie an der Universität Rostock (Hauptfach: Tierphysiologie; Nebenfächer: Molekularbiologie, Biochemie, Medizinische Mikrobiologie), Abschluss: akademischer Grad Diplom-Biologin - <i>Thema der Diplomarbeit</i> : „Quantifizierbare morphologische Veränderungen von Säugerzellen <i>in vitro</i> als Indikator für estrogene Wirkungen“
03/2003-09/2006	Tätigkeit als studentische Hilfskraft im Parasitologischen Labor der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsklinik Rostock
09/2006-09/2009	Promotion an der Universität Rostock (gefördert durch ein Stipendium der Landesgraduierten-Förderung Mecklenburg-Vorpommern) mit dem Thema: „24- <i>nor</i> -Ursodeoxycholsäure – eine neue antiinflammatorische und antifibrotische Behandlungsstrategie zur Verbesserung der entzündungsassoziierten Leberfibrose im Mausmodell der <i>Schistosoma mansoni</i> Infektion.“
09/2006-12/2008	Gastwissenschaftlerin an der Medizinischen Universität Graz, Abteilung Gastroenterologie, Arbeitsgruppe für Experimentelle und Molekulare Hepatologie (Leitung: Prof. Dr. med. Michael Trauner)
seit 10/2009	Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsklinik Rostock; REMEDIS Verbundprojekt

Publikationen

- Loebermann M, Sombetzki M, Langner C, Fuchsbichler A, Gumhold J, Silbert D, Riebold D, Holtfreter M, Fickert P, Nizze H, Trauner M, Reisinger EC. Imbalance of pro- and antifibrogenic genes and bile duct injury in murine *Schistosoma mansoni* infection-induced liver fibrosis. *Trop Med Int Health*, 14(11):1418-25, 2009.
- Fickert P, Fuchsbichler A, Moustafa T, Wagner M, Zollner G, Halilbasic E, Stöger U, Arrese M, Pizarro M, Solís N, Carrasco G, Caligiuri A, Sombetzki M, Reisinger E, Tsybrovskyy O, Zatloukal K, Denk H, Jaeschke H, Pinzani M, Trauner M. Farnesoid X receptor critically determines the fibrotic response in mice but is expressed to a low extent in human hepatic stellate cells and periductal myofibroblasts. *Am J Pathol*, 75(6):2392-405, 2009.
- Holtfreter MC, Loebermann M, Klammt S, Sombetzki M, Bodammer P, Riebold D, Kinzelbach R, Reisinger EC. *Schistosoma mansoni*: Schistosomicidal effect of mefloquine and primaquine *in vitro*. *Exp Parasitol*; 127(1): 270-276, 2010.
- Martina Sombetzki, Peter Fickert, Micha Loebermann, Claudia Fuchs, Andrea Fuchsbichler, Cord Langner, Judith Gumhold, Dagmar Silbert, Diana Riebold, Martha Holtfreter, Horst Nizze, Michael Trauner, Emil C. Reisinger. 24-*nor*-ursodeoxycholic acid as novel therapeutic strategy for inflammation-induced liver fibrosis in a murine model of *Schistosoma mansoni* infection. (submitted)

Vorträge national und international

- “24-*nor*-Ursodeoxycholic Acid As Novel Therapeutic Strategy For Inflammation-induced Liver Fibrosis in a Murine Model of *S. mansoni* Infection.” EASL, Milano 2008
- „24-*nor*-Ursodeoxycholsäure unterdrückt die entzündungsassoziierte granulomatöse Leberfibrose im Mausmodell der *Schistosoma mansoni* Infektion“ KIT2010, Köln 2010

Wissenschaftliche Preise

- 2010 Forschungspreis der Gesellschaft der Internisten
 Mecklenburg/Vorpommerns
- 2010 Forschungspreis für einen wissenschaftlichen Beitrag auf dem
 Kongress für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten KIT2010

Posterbeiträge

- 2008 KIT, Innsbruck
- 2008 Falk-Symposium, Amsterdam
- 2009 ESCMID, Helsinki
- 2009 DTG, München
- 2010 KIT, Köln